

**El nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico de estudios
tóxico-moleculares para la evaluación de la calidad de aguas**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Araceli M. Clavijo Lara

Licenciada en Biología - Universidad de Granada (España) - 2006

Lugar de trabajo: Departamento de Biología Aplicada y Alimentos. Cátedra de
Bioquímica. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis

Dra. MBA. Lic. Eliana R. Munarriz

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad Buenos Aires, Argentina)
Doctora en Biología Molecular y Celular (Universidad Roma “Tor Vergata”, Italia)

Co-director

Dr. MSc. Ing. Agr. Eduardo A. Pagano

Ingeniero Agrónomo (Universidad Buenos Aires, Argentina)
Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Granada, España)

Consejero de Estudios

Dr. MSc. Ing. Agr. Jorge A. Zavala

Ingeniero Agrónomo (Universidad Buenos Aires, Argentina)
Doctor Rerum Naturalis (Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Alemania)

JURADO DE TESIS

Dra. Paola Lax

Centro de Zoología Aplicada
– Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales – U.N.C.
IDEA – CONICET

Dra. María Semmartin

Recursos Naturales y Ambiente
– Facultad de Agronomía – U.B.A.
IFEVA – CONICET

Dr. Hochbaum Daniel

Lab. Biología del Desarrollo de las Plantas
– Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – U.B.A.
DBBE – CONICET

Fecha de defensa de la tesis: 15 de Septiembre de 2017.

A Antonio, Araceli y Rosa, mi adorada tribu.

Esto no es el final. Ni tampoco es el principio del final.
Pero quizás sea el final del principio.
W. Churchill

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias de todo corazón a todos aquellos que han sabido brindarme el apoyo que necesité en este largo viaje que comenzó en el año 2013.

Agradezco a mi directora de tesis, la Dra. Eliana Munarriz, por creer en mí desde el principio y ayudarme a crecer en este tiempo.

Agradezco al Dr. Ing. Agr. Eduardo Pagano, mi codirector y jefe de la Cátedra de Bioquímica de la FAUBA, por apostar por todo el grupo brindándonos las herramientas necesarias para nuestro trabajo y en mi caso particular, por confiar en mí y dar el pistoletazo de salida.

A la Dra. Florencia Kronberg por ser compañera y amiga en estos años. Por solucionar los *problemas graves* y no bajar la guardia nunca con nosotras. A la Ing. Agr. Aldana Moya por andar contando gusanos conmigo a horas absurdas. Y por ser una muy buena amiga. Gracias a las dos por haber alegrado mis días de trabajo.

A la Dra. Romina Giacometti, Daniela Tejedor y la Dra. Natalia Ilin, por su amistad y su apoyo constante.

A toda la gente de la cátedra de Bioquímica de la FAUBA y del INBA-CONICET, por compartir cada día juntos, por construir un lugar de trabajo en el que todos nos ayudamos mutuamente y con la mejor disposición luchamos para que el lugar crezca.

A la Dra. Ariana Rossen, por ser la mejor compañera para escribir papers. Por las horas pindaleras o en casa y por las charlas amigas.

A todos los profesionales con los que establecimos colaboraciones en algún momento de toda esta aventura y que resultaron ser excelentes: el Ing. Agr. José Morabito y su grupo de trabajo del Instituto Nacional del Agua de Mendoza, el Lic. Daniel Calvo del Instituto Nacional del Agua – sede Ezeiza y el Ing. Agr. Daniel Grenón de Facultad de Ciencias Agrarias - Universidad Nacional del Litoral.

A la gente de Pergamino que nos abrieron sus casas y nos permitieron realizar el trabajo.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica Argentina, que a través de su PID 0032/2011 me permitió iniciar la investigación para mi tesis doctoral. Agradezco también a CONICET por haberme otorgado la beca de finalización de doctorado sin la cual no hubiese podido hoy terminar este proyecto.

A la UBA, universidad pública, gratuita y universal, por haberme permitido realizar mi posgrado. Por tener la máxima calidad y formar a los estudiantes de la mejor manera posible.

A los integrantes del jurado, la Dra. Semmartin, el Dr. Hochbaum y la Dra. Lax, por sus opiniones brindadas para mejorar el presente trabajo.

A Giorgio, Carlo y Madda, por acompañarme desde el país de la bota, manteniendo viva una amistad de tantos años.

A la madrina, que monitorea siempre de cerca y con cariño los pasos que doy en la vida.

A la familia Pagano que hicieron más fáciles los primeros días en la gran ciudad.

A Carol y Juani, mi regalo vietnamita.

A las ladies: Ceci, Olga, Ana y Adri; grandes mujeres que me acompañaron estos años con sus enseñanzas de vida.

A Megi por recorrer conmigo parte de este camino.

A mis amigos de la vida, Diego, Ángel, Leyla, Nat, Néstor, Erika, Mariescuerso, Rocío, Arme, Corolain, Migue, Virgilio, Paco, Carlos, que acortaron distancias en estos años, en los momentos fáciles y en los difíciles, con mensajes, fotos y gestos continuos de apoyo y cariño.

A mis familias materna y paterna, por ser tantos y tan divertidos. Por esperar con los brazos abiertos mi llegada y poner todo el empeño en entender de qué iba eso de los gusanos.

A las primis, por ser hermanas.

A Alex, hermanito y compañero de viajes. Por acudir a darme amor cuando lo necesitaba.

A JP, que tomó mi mano hacia el final de esta aventura. Y aún hoy la sostiene fuerte. Gracias por haberme transmitido tu sensibilidad por las cosas simples de la vida. Gracias por tu amor.

A mis padres y a mi hermana, por apoyar cada proyecto de mi vida de manera incondicional, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida; por su leal apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo y la distancia. Gracias por quererme tanto y hacérmelo sentir en todo momento.

A la vida, por ser maravillosa y darme siempre un motivo estupendo para seguir sonriendo.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Clavijo, A., Rossen, A., Calvo, D., Kronberg, M.F., Moya, A., Pagano, E.A., Munarriz, E.R., 2017. Water quality and toxicological impact assessment using the nematode *Caenorhabditis elegans* bioassay in a long-term intensive agricultural area. Water, Air & Soil Pollution, 228(9), 333.

Clavijo, A., Kronberg, M.F., Rossen, A., Moya, A., Calvo, D., Salatino, S.E., Pagano, E.A., Morábito, J.A., Munarriz, E.R., 2016. The nematode *Caenorhabditis elegans* as an integrated toxicological tool to assess water quality and pollution. Science of the Total Environment, 569, 252-261

Clavijo, A., Calvo, D., Rossen, A., Salatino, S.E., Morábito, J.A., Kronberg, M.F., Moya, A., Munarriz, E.R., 2016. Evaluación estacional de las aguas del río Tunuyán (Mendoza) mediante ICA y el empleo de *C. elegans* como indicador biológico. En: IFRH 2016 - 3er. Encuentro de Investigadores en Formación en Recursos Hídricos: Resúmenes. Editado por Martín Sabarots Gerbec... [et.al.]. - 1a ed. - Ezeiza: Instituto Nacional del Agua. ISBN 978-978-45194-6-7

Clavijo, A., Kronberg, M.F., Moya, A., Pagano, E.A., Munarriz, E.R., 2015. Utilización del nematodo *C. elegans* en ensayos de toxicidad de muestras de agua en cultivos de la región pampeana. En: Libro de resúmenes del XXV Congreso Nacional del Agua, *Conagua* 2015, Argentina. ISBN 978-987-27407-4-0

Clavijo, A., Salatino, S.E., Kronberg, M.F., Rossen, A., Hernández, R., Pagano, E.A., Munarriz, E.R., 2015. Análisis ecotoxicológico de las aguas de los ríos Tunuyán y Mendoza (Mendoza) mediante el empleo de *C. elegans* como indicador biológico. En: Libro de resúmenes del XXV Congreso Nacional del Agua, *Conagua* 2015, Argentina. ISBN 978-987-27407-4-0

Moya, A., Kronberg, M.F., Clavijo, A., Mazzarella, D., Pagano, E.A., Munarriz, E.R., 2015. Plaguicidas disruptores endócrinos, uso del nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico. Publicado en la Revista SNS, N° 7, enero-marzo de 2015 ISSN 2314-2901

Kronberg, M.F., Clavijo, A., Moya, A., Heredia, O., Pagano, E.A., Munarriz, E.R., 2014. Utilización del nematodo *Caenorhabditis elegans* en ensayos de toxicidad de muestras de agua. En: IFRH 2014 - 2° Encuentro de Investigadores en Formación en Recursos Hídricos: Resúmenes. Editado Damiano Tagliavini ... [et.al.]. - 1a ed. - Ezeiza: Instituto Nacional del Agua. ISBN 978-987-45194-2-9

INDICE GENERAL

Capítulo 1. Introducción	2
1.1. <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo	2
1.1.1. Clasificación taxonómica.....	2
1.1.2. Historia	4
1.1.3. Características fisiológicas y anatómicas.....	5
1.1.4. Ciclo de vida	6
1.1.5. Ventajas de <i>C. elegans</i> como modelo biológico	8
1.1.6. <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo toxicológico.....	9
1.1.7. <i>Caenorhabditis elegans</i> como bioindicador ambiental.....	12
1.2. Manejo del recurso hídrico	13
1.2.1. Estado del arte.....	13
1.2.2. Gestión de los recursos hídricos	14
1.2.3. Evaluación de la calidad del agua	17
1.2.4. Agricultura y calidad de agua	19
1.3. Glifosato.....	22
1.3.1. Formulaciones comerciales de glifosato	22
1.3.2. Comportamiento y persistencia.....	24
1.3.3. Toxicidad	26
1.3.4. Marco legal de productos fitosanitarios. Registro e instrumentos regulatorios	28
1.3.5. Uso del glifosato en Argentina	29

1.4. Objetivos	31
1.4.1. Objetivo general.....	31
1.4.2. Objetivos específicos	32
1.5. Contenido	33
Capítulo 2. Materiales y metodología.....	35
2.1. Mantenimiento y procesamiento de <i>C. elegans</i>	35
2.1.1. Medios de cultivo para el nematodo y <i>E. coli</i>	35
2.1.2. Sincronización de los nematodos	36
2.1.3. Conservación y recuperación de <i>C. elegans</i>	37
2.1.4. Transferencia y esterilización del nematodo en placas	38
2.2. Bioensayos con <i>C. elegans</i>	39
2.2.1. Efecto crónico del glifosato comercial sobre el ciclo de vida del nematodo	39
2.2.2. Ensayos con aguas	40
2.3. Análisis de crecimiento, reproducción y fertilidad de <i>C. elegans</i>	41
2.4. Detección de especies reactivas del oxígeno (ERO).....	42
2.5. Extracción de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR).....	42
2.6. Cuantificación de la actividad catalasa	45
2.7. Obtención y conservación de muestras de agua.....	46
2.7.1. Pergamino (Buenos Aires).....	46
2.7.2. Río Tunuyán (Mendoza).....	47
2.8. Determinación de parámetros fisicoquímicos <i>in situ</i>	48
2.9. Determinaciones analíticas	48
2.9.1. Determinación de glifosato y AMPA	48

2.9.1.1. Calibración	49
2.9.1.2. Determinación	50
2.9.2. Determinación de cationes por técnica de absorción atómica	51
2.9.3. Determinación de aniones carbonato y bicarbonato	52
2.9.4. Determinación de cloruros	53
2.9.5. Determinación de sulfatos	54
2.9.6. Determinación de nitratos	55
2.9.7. Determinación de la relación de absorción de sodio (RAS)	56
2.9.8. Determinación del fósforo total	56
2.9.9. Determinación de fosfato soluble	57
2.9.10. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno	57
2.9.11. Análisis bacteriológicos	57
2.10. Diagrama de Piper	58
2.11. Índice de categorización de efectos tóxicos	58
2.12. Índice de Calidad de Aguas (ICA)	58
2.13. Análisis estadístico	61
Capítulo 3. Estudio de la respuesta de <i>C. elegans</i> tras la exposición a glifosato	67
3.1. Introducción	67
3.2. Objetivos	69
3.3. Resultados y discusión	70
3.3.1. Efecto crónico del glifosato sobre el ciclo de vida del nematodo <i>C. elegans</i>	70
3.3.2. Generación de ERO inducida por glifosato	73

3.3.3. Respuesta específica del estrés oxidativo inducida por formulaciones comerciales de glifosato.....	76
3.4. Conclusiones	78
Capítulo 4. Caracterización de aguas de la región Pampeana. Uso de <i>C. elegans</i> para la evaluación de la toxicidad	81
4.1. Introducción	81
4.1.1. Selección de la zona de estudio	81
4.2. Objetivos	87
4.3. Resultados y discusión	88
4.3.1. Análisis de parámetros fisicoquímicos	88
4.3.2. Caracterización hidrogeoquímica	97
4.3.3. Cálculo del ICA	99
4.3.4. Determinación de glifosato y AMPA	100
4.3.5. Bioensayo con <i>C. elegans</i> para la determinación de la calidad de aguas	105
4.3.6. Categorización de efectos tóxicos.....	112
4.4. Conclusiones	114
Capítulo 5. <i>Caenorhabditis elegans</i> como herramienta integrada para la evaluación de la calidad y toxicidad en una cuenca de río de la provincia de Mendoza	118
5.1. Introducción	118
5.1.1. Selección de la zona de estudio	119
5.2. Objetivos	123
5.3. Resultados y discusión	124
5.3.1. Análisis de parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos	124

5.3.2. Cálculo del ICA	133
5.3.3. Bioensayo con <i>C. elegans</i> para la determinación de la calidad de aguas	135
5.3.4. ACP.....	138
5.3.5. Modelo linear multivariado y regresión simple del crecimiento relativo <i>versus</i> el ICA	141
5.4. Conclusiones	144
Capítulo 6. Conclusiones generales y perspectivas futuras	146
Bibliografía	157
Apéndices	180
Apéndice 1. Normativa internacional en materia de agroquímicos	181
Apéndice 2. Normativa nacional ambiental. Uso y comercialización de plaguicidas	182
Apéndice 3. Normativa nacional e internacional de calidad de aguas para la construcción del ICA de la región pampeana.....	185

INDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Cebadores utilizados.....	44
Cuadro 2.2. Volúmenes inyectados de fase móvil.....	50
Cuadro 2.3. Límites de detección de cationes por espectrofotometría.....	51
Cuadro 2.4. Interpretación de la titulación	53
Cuadro 3.1. Valores de CE50 del formulado comercial de glifosato para <i>C. elegans</i>	72
Cuadro 4.1. Caracterización de los puntos de muestreo en la cuenca de Pergamino.....	87
Cuadro 4.2. Parámetros fisicoquímicos y concentraciones de glifosato y AMPA en las muestras de agua.....	92
Cuadro 4.3. Niveles de glifosato en los sitios destinados a aguas para consumo ($\mu\text{g L}^{-1}$)..	104
Cuadro 4.4. Crecimiento relativo de <i>C. elegans</i> en muestras de agua de los diferentes sitios de la cuenca del río Pergamino.	110
Cuadro 5.1. Localización, coordenadas y características de los sitios seleccionados en la cuenca del Tunuyán.	123
Cuadro 5.2. Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua de la cuenca del Tunuyán.	128
Cuadro 5.3. Parámetros bacteriológicos de las muestras de agua de la cuenca del Tunuyán.....	131
Cuadro 5.4. Autovectores del ACP.....	140
Cuadro 5.5. Diferentes modelos lineales considerando al crecimiento relativo de <i>C. elegans</i> como variable dependiente.....	142

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Comparaciones de las divergencias evolutivas en genes SSU rRNA entre pares de especies dentro de los nematodos y deuterostomados.....	3
Figura 1.2. Anatomía de <i>Caenorhabditis elegans</i>	6
Figura 1.3. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> a 20 °C.....	7
Figura 1.4. Estructura química y modelo de enlaces del glifosato.....	23
Figura 1.5. Estructura química de la polioxiethyl amina (POEA)	24
Figura 1.6. Estructura química y modelo de enlaces del AMPA.	25
Figura 2.1. Bioensayo con <i>C. elegans</i> , de acuerdo con métodos estándar.	40
Figura 3.1. Mecanismos de protección del estrés oxidativo.	69
Figura 3.2. Test de toxicidad crónica con <i>C. elegans</i>	71
Figura 3.3. Producción de ERO en nematodos expuestos a glifosato.....	74
Figura 3.4. Análisis cuantitativo por RT-PCR de genes involucrados en la respuesta a estrés oxidativo en nematodos expuestos a glifosato.....	76
Figura 3.5. Análisis cuantitativo por RT-PCR de genes de catalasa (A) y actividad específica de la catalasa (B) en nematodos expuestos a concentraciones crecientes de glifosato.	77
Figura 4.1. Zona de estudio.....	82
Figura 4.2. Límite (divisoria de aguas) de la cuenca del Río Arrecifes, red hidrográfica y bañados.....	83
Figura 4.3. Mapa de la zona de estudio.....	84
Figura 4.4. Imagen satelital de la zona de estudio.....	85
Figura 4.5. Gráficos boxplot de las diferencias entre grupos de agua para 5 parámetros fisicoquímicos, según análisis ANAVA no paramétrico (Kruskal-Wallis).....	94
Figura 4.6. Diagrama de Piper para los diferentes puntos de monitoreo.	98
Figura 4.7. Valores del ICA de los sitios de monitoreo de la cuenca del río Pergamino.....	99
Figura 4.8. Porcentajes de muestras con presencia de glifosato, AMPA o ambos.....	102
Figura 4.9. Crecimiento (A), reproducción (B) y fertilidad (C) de <i>C. elegans</i> tras la exposición.....	106
Figura 4.10. Valores medios de crecimiento relativo, representados en boxplots, para los diferentes grupos de muestras de agua (A) y en las diferentes estaciones (B).	111
Figura 4.11. Categorización de efectos tóxicos sobre el crecimiento relativo de <i>C. elegans</i> en las diferentes muestras de agua.	112
Figura 5.1. Área de estudio y sitios de monitoreo en la cuenca del río Tunuyán.	122

Figura 5.2. Representación en boxplots del análisis no paramétrico de Mann-Whitney..	132
Figura 5.3. Datos del ICA para los diferentes sitios de monitoreo de la cuenca del río Tunuyán.....	134
Figura 5.4. Análisis no paramétrico (Test de Mann-Whitney $p=0,0003$) de los valores del ICA por subcuencas (A) y por estaciones: otoño e invierno (O-I) <i>versus</i> primavera y verano (P-V) (B).....	135
Figura 5.5. Crecimiento relativo de <i>C. elegans</i> a lo largo de los sitios de monitoreo.	136
Figura 5.6. Análisis no paramétrico (Test de Mann-Whitney $p=0,0003$) de los valores de crecimiento relativo de <i>C. elegans</i> analizados por subcuencas (A) y por estaciones: otoño e invierno (O-I) <i>versus</i> primavera y verano (P-V) (B).....	137
Figura 5.7. Crecimiento relativo de <i>C. elegans</i> en los diferentes meses de monitoreo.....	138
Figura 5.8. Representación del ACP de los sitios de monitoreo según el crecimiento relativo de <i>C. elegans</i> y los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos... ..	139
Figura 5.9. Análisis de regresión entre el crecimiento relativo de <i>C. elegans</i> y los valores del ICA.	143

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AMPA	Ácido amino metilfosfónico
CASAFE	Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes de Argentina
CCME	Consejo Canadiense de Ministros del Ambiente
cDNA	DNA complementario o copia
CE	Conductividad Eléctrica
CE50	Concentración efectiva de un químico que causa el 50% de determinada respuesta en un tiempo determinado.
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CGC	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Center
CONABIA	Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DRA	Dosis de Referencia Aguda
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERO	Especie Reactiva del Oxígeno
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
ESP	Enzima 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAT	Gen Glifosato N-acetil Transferasa
GFP	Proteína Verde Fluorescente, del inglés <i>green fluorescent protein</i>

HPLC-MASA	Cromatografía Líquida de Alta Resolución con espectrometría de masas
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, del inglés <i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICA	Índice de Calidad de Aguas
MINAGRI	Ministerio de Agroindustria de Argentina
MIP	Manejo Integrado de Plagas
NGM	Medio de cultivo estandarizado para nematodos, del inglés <i>Nematode Growth Medium</i>
NOAEL	Nivel sin efecto adverso observable
NRC	Consejo Nacional de Investigación, Canada (<i>National Research Council</i>).
OD	Oxígeno Disuelto
OGM	Organismos Genéticamente Modificados
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de Naciones Unidas
ORP	Potencial de óxido reducción
POEA	Polioxietileno-amina
RAS	Relación de Absorción de Sodio
RR	Cultivos desarrollados en la década de 1980 y que son tolerantes a herbicidas de la familia Roundup®. Del inglés <i>Roundup Ready</i>
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina
SSU rRNA	Subunidad pequeña del ácido ribonucleico ribosómico (rRNA)
TSD	Total de Sólidos Disueltos

RESUMEN

Caenorhabditis elegans es un nematodo saprófito de vida libre que habita en el suelo y la hojarasca terrestre que se ha convertido en un importante organismo modelo animal en toxicología. Las características que han contribuido a su éxito son su genoma bien caracterizado y descrito, facilidad de mantenimiento en laboratorio, ciclo de vida corto y prolífico, y pequeño tamaño del cuerpo. Además, la mayoría de sus procesos fisiológicos son similares a los de organismos superiores, incluyendo humanos. El objetivo de esta tesis fue establecer en Argentina al nematodo *C. elegans* como una herramienta toxicológica integral tanto para complementar el monitoreo tradicional de aguas como para caracterizar los mecanismos moleculares activados por los agroquímicos de uso frecuente en nuestro país. Se utilizó el crecimiento relativo del nematodo para evaluar los efectos toxicológicos en dos cuencas argentinas: río Pergamino (Buenos Aires) y río Tunuyán (Mendoza). Estos resultados se analizaron junto con los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos, así como con su correspondiente valor de un Índice de Calidad de Aguas elaborado para cada cuenca. Se demostró que el crecimiento de *C. elegans* es una herramienta útil para detectar toxicidad, incluso cuando la calidad del agua cumple con los parámetros regulatorios vigentes. Además se estudiaron los efectos de una formulación comercial del herbicida glifosato sobre el ciclo de vida de *C. elegans*. Se realizó la caracterización molecular de la respuesta del nematodo mediante el estudio de la expresión de genes de las vías de estrés oxidativo. La información obtenida en esta tesis permitió evaluar la situación toxicológica actual de las regiones de estudio y contribuirá a establecer reglamentaciones para proteger el ambiente y la salud de la población rural.

Palabras clave: recursos hídricos, bioensayo, toxicología ambiental, glifosato, Argentina.

ABSTRACT

The soil nematode *Caenorhabditis elegans* is a ubiquitous free-living organism that has become an important animal model in aquatic and soil toxicology. Characteristics of this model that have contributed to its success include its well and fully described genome, ease of maintenance, short and prolific life cycle, and small body size. Moreover, most of their physiological processes are conserved in higher organisms, including humans. The aim of this thesis was to establish the nematode *C. elegans* in Argentina as an integrated tool to complement traditional water monitoring system and also to characterize the molecular mechanisms activated after the exposure to chemicals frequently used in the country. The Tunuyán and the Pergamino River Basins have been selected as representative of traditional water monitoring systems. In order to generate an integrated water quality assessment, the *C. elegans* relative growth bioassay was performed on them. These results were analyzed together with physicochemical and bacteriological parameters and compared to a specific Water Quality Index developed for each basin. It was shown that *C. elegans* bioassay is a sensible and suitable tool to detect toxicity even when water samples met regulatory requirements. Furthermore, the effects of a commercial formulation of **glyphosate** herbicide on the life cycle of *C. elegans* were studied. Gene expression of the oxidative stress response was characterized. On the basis of this thesis, the current toxicological status of these regions was evaluated. These toxicological studies may contribute in the future to establish regulations to protect both the environment and the rural population health.

Key words: water resources, bioassay, environmental toxicology, glyphosate, Argentina

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

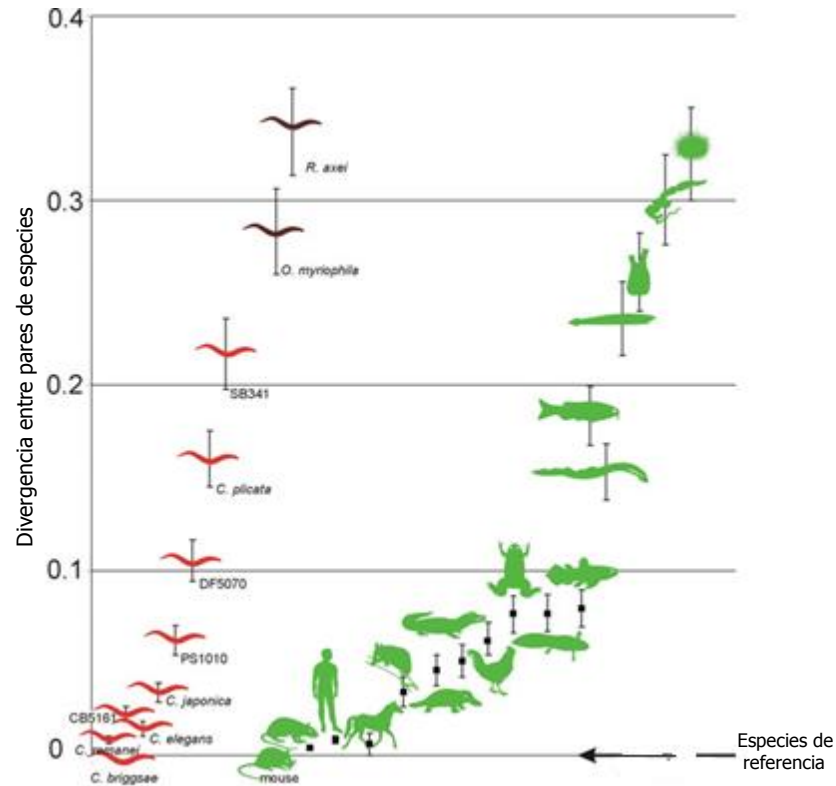
Capítulo 1. Introducción

1.1. *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo

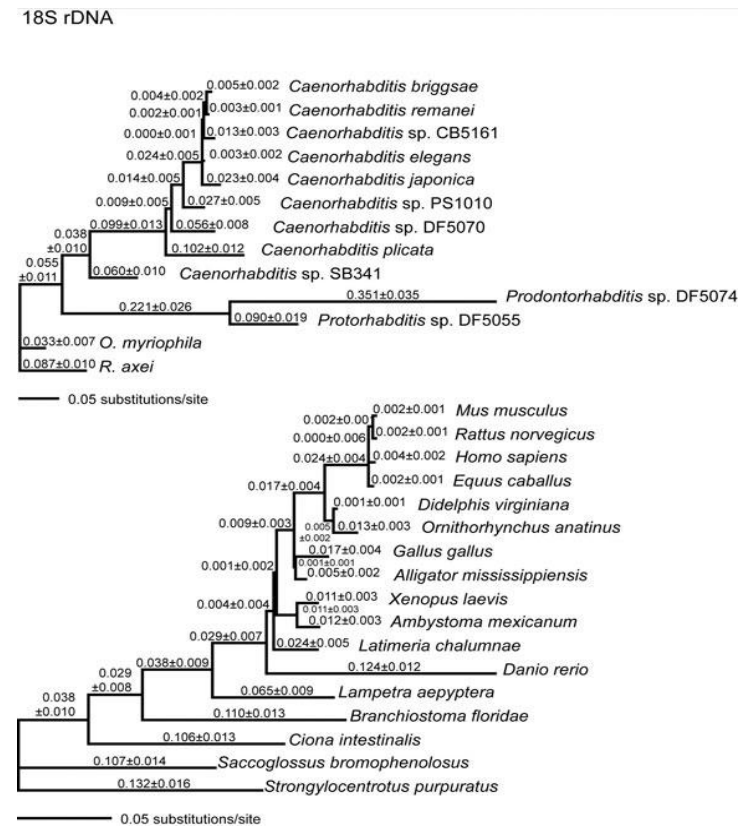
1.1.1. Clasificación taxonómica

Su nombre procede del latín y griego: *caeno* (reciente), *rhabditis* (palito), *elegans* (elegante). Es un nematodo del género *Caenorhabditis*, familia Rhabditidae, orden Rhabditida, clase Chromadorea, filo Nematoda, metazoo y eucariota (Taxonomía NCBI – Centro Nacional de Información sobre Biotecnología, del inglés, *National Center for Biotechnology Information*). Inicialmente fue descrito como *Rhabditis elegans* (Maupas, 1900) y, posteriormente, se clasificó como *Caenorhabditis elegans* (Dougherty, 1955). Es un organismo que forma parte de las 25.000 especies de nematodos descritas (Zhang et al., 2016).

Este gusano saprofita de vida libre habita en el suelo y la hojarasca de lugares templados y húmedos (Barrière & Félix, 2005). Ciertos estudios han indicado una asociación entre el nematodo y gasterópodos terrestres, además de otros pequeños organismos habitantes del suelo (Brenner, 2003; Fire, 2007). Los nematodos se separaron de otros animales muy antiguamente; sus tasas de evolución molecular son mucho más rápidas en ellos que en deuterostomados. No existe una estimación fiable de la fecha de divergencia debido a la considerable tasa de heterogeneidad entre los distintos linajes de genes; por consiguiente, la mejor medida de la diferenciación taxonómica en Rhabditida es la cantidad relativa de las diferencias en las secuencias (Kiontke & Fitch, 2005) (Fig. 1.1.).



A



B

Figura 1.1. (A) Comparaciones de las divergencias evolutivas en genes SSU rRNA entre pares de especies dentro de los nematodos (rojo) y deuterostomados (verdes). Las divergencias entre pares se estimaron mediante la suma de las longitudes de las ramas que intervienen entre taxones en (B); las desviaciones estándar (barras de error) se calcularon como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las desviaciones estándar de estas ramas. **(B) Filograma de probabilidad de los genes de las subunidades pequeña y grande del ADN ribosómico (ADNr SSU y ADNr LSU) y los genes RNAP2, par-6 y pkc-3 utilizados para calcular las divergencias graficadas en (A)** (Kiontke et al., 2004).

1.1.2. Historia

Victor Nigon de la Universidad de Lion (Francia) en 1949 colectó una de las primeras cepas de *C. elegans* con importancia histórica, denominada *Bergerac* (Nigon, 1949). Años más tarde, fue aislada la cepa *Bristol* por L.N. Staniland (Servicio Nacional de Asesoramiento Agrícola, Londres) de una muestra de compost de Bristol, Inglaterra (Nicholas et al., 1959). Sin embargo no fue hasta 1974, cuando el laureado Nobel Sydney Brenner obtuvo la línea N2, que deriva de la cepa Bristol, proponiendo a este organismo como un modelo biológico emergente basándose en la simplicidad de su sistema nervioso y la posibilidad de ser manipulado con facilidad (Brenner, 1974). En esa fecha los grandes avances en los conocimientos sobre genética y biología molecular se habían conseguido gracias a la utilización de organismos simples como virus y bacterias, que ofrecían la oportunidad de trabajar con grandes cantidades de individuos y con tiempos de generación muy cortos. Hasta entonces existían otros modelos animales bien consolidados, tales como la mosca *Drosophila melanogaster* o el ratón *Mus musculus*; sin embargo, *C. elegans* ofrecía la posibilidad de trabajar con un modelo que presentaba el equilibrio justo entre lo sencillo de su uso y mantenimiento en el laboratorio y lo complejo de su biología.

Quizás, una de las pruebas más relevantes de la importancia del uso de *C. elegans* como organismo modelo está ejemplarizada por la concesión de los premios Nobel de fisiología y medicina en los años 2002 y 2006, y de química en 2008, a científicos que realizaron su investigación y aportes fundamentales a la ciencia utilizando este nematodo. En concreto, Sydney Brenner, Robert Horvitz y John Sulston, por sus estudios sobre el proceso de apoptosis o muerte celular programada (Brenner, 2003; Sulston & Hodgkin, 1988), Andrew Fire y Craig Mello por el descubrimiento del ARN

de interferencia en el año 2007 (Fire, 2007) y Martin Chalfie en 2009 por la aplicación de la proteína verde fluorescente (GFP) en el estudio de la expresión génica.

1.1.3. Características fisiológicas y anatómicas

El genoma de *C. elegans* posee 97×10^7 pares de bases, 1/30 del humano, habiendo sido intensamente estudiado a través de animales mutantes, transgénicos y con genes noqueados, como así también mediante la técnica de interferencia de ARN, descubierta en esta especie (Fire et al., 1998). Este nematodo fue el primer organismo multicelular del cual se obtuvo la secuencia completa de su genoma (*Caenorhabditis elegans* Sequencing Consortium, 1998; Hodgkin & Herman, 1998).

Caenorhabditis elegans es un organismo hermafrodita que puede reproducirse por autofecundación (produce tanto ovocitos como espermatozoides) aunque no puede fertilizar a otros hermafroditas. Tiene 5 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales. Si el sexto par es XX da lugar a un hermafrodita, mientras que si es XO se produce un macho. En condiciones naturales el porcentaje de ocurrencia de especímenes masculinos es menos del 0,05% del total. El hermafrodita adulto tiene 959 células somáticas y el macho 1031. Es un animal eutélico en su fase adulta, es decir, tanto el número de células como su posición son constantes en la especie.

Ambos sexos tienen un tamaño similar (Fig. 1.2.). El adulto tiene una estructura bilateral simétrica, vermiforme, con un cuerpo cilíndrico tubular típico de cualquier nematodo (Altun et al., 2012). Su estructura anatómica está conformada por una boca, faringe, intestino, gónadas y una cutícula de colágeno. El orificio bucal aparece en el extremo anterior de la cabeza y le permite ingerir las bacterias con las que se alimenta (Fig.1.2.); el ano se ubica en la zona ventral, cerca de la región posterior. Los machos

tienen una sola gónada, vasos eferentes y una cola especializada para la cópula. Los hermafroditas poseen dos ovarios, oviductos, una cavidad para almacenar el esperma y un útero.

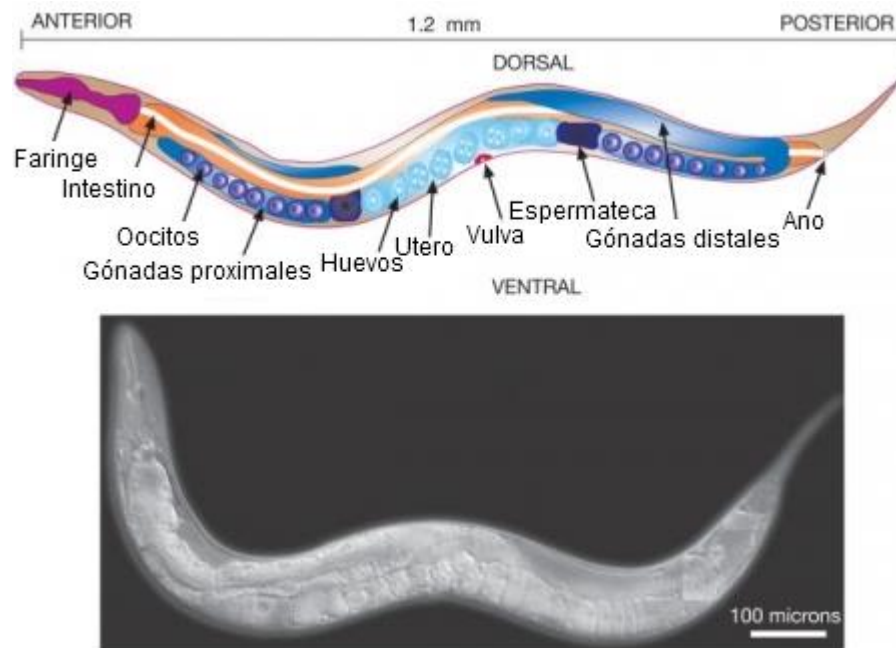


Figura 1.2. Anatomía de *Caenorhabditis elegans*. Adaptado de York et al., 2014.

1.1.4. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *C. elegans* consta de una fase embrionaria, seguido de cuatro estadios larvales (llamados L1, L2, L3 y L4) y los adultos. Cada etapa larval se caracteriza por patrones específicos de división y diferenciación celular, estando marcadas por una muda de cutícula (Casada & Russell, 1975). Es un ciclo de vida corto, pues en condiciones de laboratorio normales a 20 °C, ocurre en 4 días (Fig. 1.3.). El desarrollo embrionario se produce durante unas 14 h y el postembrionario durante 43 h. Este nematodo puede crecer en un amplio rango de temperaturas, de tal manera que con el aumento de la misma se eleva también su tasa de crecimiento, variando así la longitud

de su ciclo desde los 6 días a 15 °C hasta los 3 días a 25 °C. A lo largo de su vida genera entre 200 y 300 huevos. Estos se deponen aproximadamente en la fase de 30 células (Yochem, 2006).

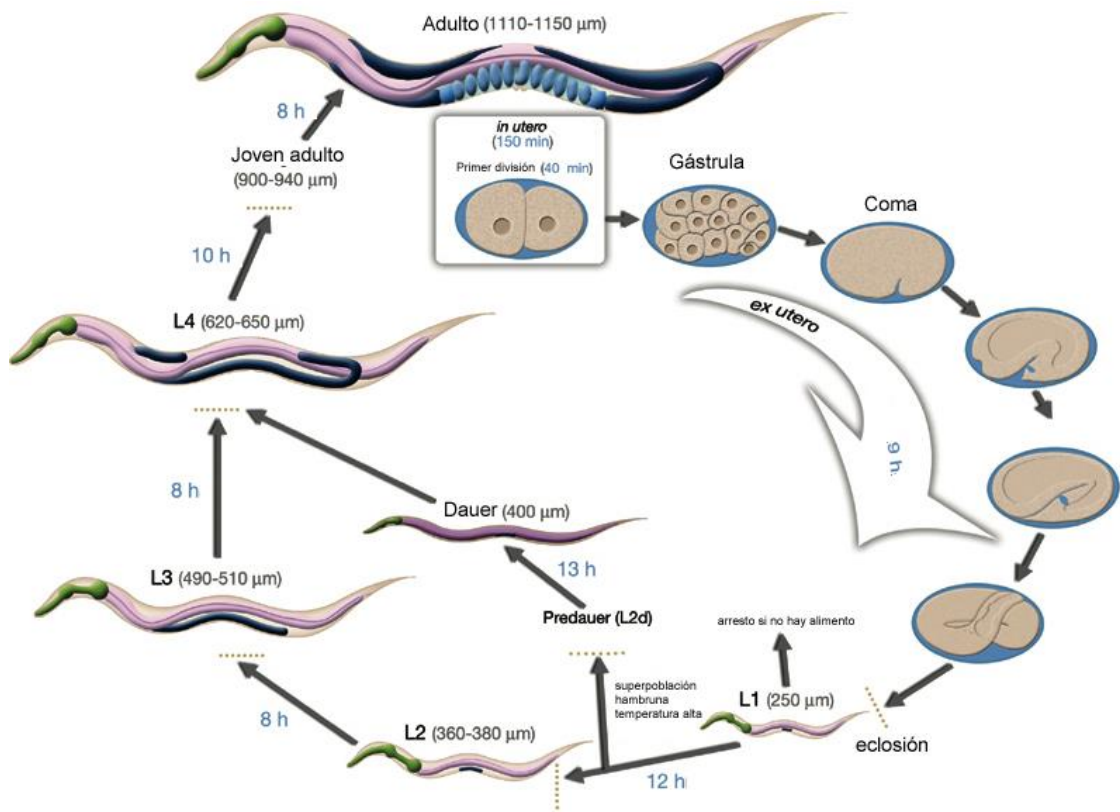


Figura 1.3. Ciclo de vida de *C. elegans* a 22 °C. Se indica en azul el tiempo entre cada muda larval y la longitud corporal (µm) para cada etapa de desarrollo. Modificado de Altun et al., 2012.

Además de la temperatura, el ciclo de vida de *C. elegans* depende también de otros factores. Hacia el final del estadio L2, si las condiciones del medio son desfavorables (hacinamiento o ausencia de alimento) pueden estimular la formación de un estadio intermedio L2d (denominado *dauer* o diapausa) que detiene su desarrollo y no se alimenta, pudiendo permanecer en esa condición alrededor de 4 meses (Albert & Riddle, 1988). Estas larvas *dauer* alteran su metabolismo energético y acumulan grasa en el hipodermo y las células intestinales. Son delgadas y su boca sufre un sellado tal

que no pueden comer, permaneciendo inmóviles la mayor parte del tiempo a menos que sean tocadas. Una vez que las condiciones ambientales son nuevamente propicias, continúa su desarrollo normal, mudando a L4 (Hodgkin & Barnes, 1991) (Fig. 1.3.).

1.1.5. Ventajas de *C. elegans* como modelo biológico

Distintas características de este nematodo han acrecentado su popularidad como modelo animal para la investigación en el campo de las ciencias biológicas. Su mantenimiento en el laboratorio es económico y sencillo ya que su dieta se basa en la bacteria *Escherichia coli* (Altun et al., 2012). Su elevado potencial reproductivo permite la producción a gran escala en un periodo corto de tiempo. Tiene un tamaño corporal pequeño (1,3 mm el adulto en ambos sexos), que posibilita llevar a cabo ensayos *in vivo* en microplacas de 96 pocillos; es un organismo de relativa simplicidad desde el punto de vista anatómico: su cuerpo es transparente y su linaje celular es invariable, lo cual permite la observación, en preparaciones vivas, de todas sus células desde el desarrollo embrionario hasta el animal adulto (Yochem, 2006). Su manipulación es sencilla, se pueden hacer experimentos genéticos y transgénicos de manera más fácil y menos costosa que en otros modelos animales, ofreciendo la posibilidad de estudiar en detalle mecanismos biológicos a nivel molecular, con alta reproducibilidad en los resultados (Fire, 2007; Wah Chu & Chow, 2002). Otra ventaja que presenta es que puede ser congelado y mantenido durante largo tiempo a -80 °C o a medio plazo en el estadio *dauer*.

La mayoría de las cepas de este nematodo que se han utilizado durante los últimos 30 años han sido depositadas por los diferentes laboratorios de investigación en el *Caenorhabditis* Genetics Center (Centro Genético para *Caenorhabditis*: CGC) de la

Universidad de Minnesota, el cual no sólo cumple la función de mantener la colección de mutantes sino que también los distribuye comercialmente con un costo mínimo. Asimismo, la comunidad científica ha desarrollado importantes herramientas bioinformáticas imprescindibles para la planificación cotidiana de experimentos. Entre ellas cabe destacar *Wormbase* en la cual se encuentra información acerca de la estructura, secuencia y función de todos los genes de *C. elegans*, como así también alelos mutantes y reactivos disponibles. También recapitula toda la bibliografía publicada hasta el momento (Harris et al., 2010).

Pero la característica más importante, que convierte a *C. elegans* en un excelente modelo biológico, es que existe una gran similitud genética y fisiológica con el humano; entre un 60% y un 80% de homología (Kaletta & Hengartner, 2006). De hecho, la mayoría de sus procesos fisiológicos básicos y de respuesta a estrés están conservados tanto en otros nematodos parásitos como en organismos superiores (incluyendo humanos).

1.1.6. *Caenorhabditis elegans* como modelo toxicológico

Esta especie se ha convertido en un importante modelo animal, tanto en el campo de la toxicología clásica como en neurotoxicología, toxicología genética y ambiental por las ventajas antes mencionadas. Desde los primeros estudios toxicológicos llevados a cabo con nematodos de vida libre (Honda, 1924) se han venido usando diversas especies del género *Caenorhabditis* o de otros géneros emparentados como *Pristionchus* (Blaxter, 2011). Sin embargo ha sido *C. elegans* el más utilizado de manera exitosa (Hulme & Whitesides, 2011; Menzel et al., 2005). Varios autores han demostrado que este organismo posee criterios de valoración sensibles para realizar análisis

toxicológicos (Dhawan et al., 1999; Höss et al., 2013). De tal manera que representa un excelente complemento a los sistemas basados en el cultivo de células *in vitro* o a los modelos *in vivo* de vertebrados (Leung et al., 2008). Su sensibilidad es comparable con la de enquitreidos, lombrices y colémbolos, pero con la ventaja que su manejo demanda menos tiempo y espacio (Boyd et al., 2000; Cole et al., 2004; Kammenga et al., 1996). *Caenorhabditis elegans* tiene también el potencial de predecir respuestas tóxicas que son comparables con mamíferos (Anderson et al., 2004; Cole et al., 2014; Hunt et al., 2012; Raley-Susman, 2014), pero libre de los problemas éticos que conlleva la experimentación con ellos (Casey et al., 2015). Relativo a esto, se han hecho análisis *in vivo* del efecto de la exposición de sustancias fitosanitarias sobre mecanismos moleculares que se dan también en eucariotas superiores (Peterson et al., 2008; Surjo Prabha & Manoj, 2009). Varios autores han utilizado a este nematodo para analizar los riesgos potenciales de plaguicidas (Anbalagan et al., 2013; Cheng et al., 2014; Höss et al., 2013; Jafri Ali & Sharda Rajini, 2012; Leelaja & Rajini, 2013; Lewis et al., 2013; Meyer & Williams, 2014; Monteiro et al., 2014; Wang & Ezemaduka, 2014), de metales pesados (Chapman et al., 2013; Jiang et al., 2016; Swain et al., 2004) y otros productos químicos (Boyd et al., 2010; Li et al., 2012; Nam & An, 2010; Rudel et al., 2013; Sochová et al., 2007; Yamamuro et al., 2011). También se ha utilizado con éxito para evaluar los efectos farmacológicos y tóxicos de nanopartículas, conocidos como estudios de nanotoxicidad (Chen et al., 2013; Rui et al., 2013; Wu et al., 2013; Zhao et al., 2014), de toxicidad de fármacos (Matsuura et al., 2013; Smith et al., 2013) y toxinas (Leung et al., 2010). La evaluación con *C. elegans* de nanocápsulas poliméricas para la administración de medicamentos también ha mostrado resultados prometedores (Charao et al., 2015; Jung et al., 2015). Son varios los parámetros que se han usado en esos estudios, entre ellos: reproducción (Höss et al., 2013; Leelaja & Rajini, 2013; Rui et al.,

2013); fertilidad (Höss et al., 2009; Roh & Choi, 2011); esperanza de vida (Cha et al., 2012; Zhuang et al., 2014); autofluorescencia intestinal (Rui et al., 2013; Wu et al., 2013; Zhuang et al., 2014); bombeo de la faringe (Jadhav & Rajini, 2009); longitud media del ciclo de la defecación (Zhao et al., 2014); desarrollo (Helmcke & Aschner, 2010), cambio a estadio *dauer* (Wang et al., 2010), búsqueda de alimento (Monteiro et al., 2014); estrés oxidativo (Leelaja & Rajini, 2013), daño oxidativo y cambios en la expresión génica (Eom et al., 2013; Liu et al., 2012; Rudgalvyte et al., 2013), cambios en la expresión de proteínas, daño en el ADN y apoptosis (Wang & Ezemaduka, 2014). También la longitud corporal ha sido usada exitosamente para evaluar el efecto de plaguicidas sobre el nematodo (Boyd et al., 2010; Meyer & Williams, 2014; Roh & Choi, 2006).

En la recomendación del Consejo Nacional de Investigación del gobierno de Canadá sobre modelos toxicológicos alternativos al uso de animales, *C. elegans* ocupa un lugar prometedor (ALTEX, 2013). También Europa y EE.UU. son precursores y fuertes defensores de este concepto; en la Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos y experimentales se especifica en su artículo 4: *Los Estados miembros velarán para que, siempre que sea posible, se utilice una estrategia o método de pruebas científicamente satisfactorio que no implique la utilización de animales vivos*. En su artículo 47 establece: *La Comisión y los Estados miembros contribuirán al desarrollo y validación de métodos alternativos que puedan proporcionar los mismos o mayores niveles de información que los obtenidos en los procedimientos que utilizan animales superiores, pero que no impliquen el uso de animales o utilizar menos animales o que impliquen procedimientos menos dolorosos, y tomarán todas las demás medidas que consideren adecuadas para fomentar la investigación en este campo* (Hunt, 2016).

1.1.7. *Caenorhabditis elegans* como bioindicador ambiental

Durante los programas de monitoreo de la contaminación de aguas, es cada vez más frecuente que se incluyan bioensayos con organismos indicadores capaces de revelar la presencia de contaminantes (entre ellos, plaguicidas) y así proporcionar alertas tempranas de potenciales riesgos ambientales. Debido a que las muestras pueden contener tóxicos indefinidos, la inclusión de un indicador animal para complementar su análisis es muy valioso. Por otro lado, el estudio de la expresión génica puede ser muy útil al momento de evaluar la contaminación y ver cómo diferentes tóxicos (agroquímicos, entre otros) afectan a los organismos y a los ecosistemas naturales (Poynton et al., 2007). Debido a sus características génicas y fisiológicas, *C. elegans*, se ha convertido en una preciada herramienta. Existen reportes que establecen que este nematodo resulta un bioindicador útil en la evaluación del riesgo ecológico en agua, sedimentos y suelos (Anbalagan et al., 2013; Hägerbäumer et al., 2015; Höss et al., 2009; Hunt et al., 2014, 2016; Leung et al., 2008; Peredney & Williams, 2000; Xing et al., 2009). Si bien se han llevado a cabo estudios de toxicidad de lodos y sedimentos de ríos (Menzel et al., 2009), hasta el momento no ha sido extensamente utilizado en la evaluación de muestras ambientales de agua, salvo por Ju y sus colaboradores (2014) que expusieron al nematodo a muestras concentradas que se sabían contaminadas con compuestos orgánicos bromados. Se encontró neurotoxicidad pero también neuroestimulación (cambios en la locomoción y la actividad de la defecación). Efluentes de agua de riego y sedimentos recolectados en arroyos de una zona afectada por la minería también inhibieron el crecimiento del nematodo (Turner et al., 2013).

Es importante destacar que *C. elegans* es un modelo mundialmente aceptado para la evaluación del impacto ambiental como queda ratificado por las normativas

internacionales ISO 10872:2010 (ISO, 2010) y ASTM (ASTM, 2014), que especifican un método estandarizado para determinar la toxicidad de muestras sobre el crecimiento, la fertilidad y la reproducción del nematodo (Höss et al., 2012; Leung et al., 2008; Traunspurger et al., 1997).

1.2. Manejo del recurso hídrico

1.2.1. Estado del arte

La salud de los ecosistemas depende de flujos ambientales aptos para garantizar el acceso al agua y a los servicios ecosistémicos relacionados con este recurso, así como la distribución sostenible y equitativa del mismo. La calidad del agua es esencial para mantener las funciones, los procesos y la capacidad de recuperación de los ecosistemas acuáticos de los que dependen los medios de sustento y las oportunidades económicas (WWAP, 2016). El desarrollo sostenible de actividades relacionadas con la salud, educación, agricultura y producción alimentaria, dependen de una eficaz gestión, protección y provisión del recurso hídrico (WHO, 1996, 2013).

La calidad del agua es un aspecto esencial del medio hídrico, tanto en lo que respecta a la caracterización ambiental como desde la perspectiva de la planificación hidrológica, entendiéndose como un conjunto de características físicas, químicas y biológicas que hacen que el agua sea apropiada. Existen diversas normativas tendentes a asegurar la calidad suficiente para garantizar determinados usos, aunque en general no recogen los efectos y consecuencias que los requerimientos del hombre y sus actividades tienen sobre las aguas naturales: sobreexplotación y liberación de contaminantes. Estas acciones deterioran el recurso y disminuyen en general la

capacidad de resiliencia de los ecosistemas, por lo que se hace necesario atender a sus consecuencias (Emerton & Bos, 2004; Meybeck et al., 1996; UN WWDR, 2009).

El Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), a través de su Informe sobre Calidad del Agua, establece que el deterioro de la calidad y el acceso a agua para consumo se ha convertido en un motivo de preocupación a nivel mundial debido al crecimiento de la población humana, la expansión de la actividad industrial y agrícola, así como las alteraciones en el ciclo hidrológico debidas al cambio climático (Peña, 2016; UN, 2011). De hecho, en el Informe sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo del año 2016, la ONU plantea como objetivos principales por un lado apoyar la protección del agua de la sobreexplotación y la contaminación, y por otro, satisfacer los requerimientos de agua para consumo, saneamiento, generación de energía y agricultura (WWAP, 2016).

1.2.2. Gestión de los recursos hídricos

La Directiva Marco del Agua Europea ha establecido un conjunto de lineamientos para la gestión sostenible e integrada de los recursos hídricos, en el que la información ambiental sensible de datos biológicos y ecológicos desempeña un papel fundamental (EC, 2000). Otras organizaciones ambientales tales como la Red de Agua de Canadá y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) han desarrollado legislaciones que garantizan la seguridad y gobernabilidad del agua (Bakker & Cook, 2011; USEPA, 2015). En la Cumbre Mundial sobre Desarrollo Sostenible de Johannesburgo (ONU, 2002), la República Argentina junto con otros 187 países acordaron desarrollar planes de Gestión Integrada de los Recursos Hídricos para asegurar el uso eficiente del agua (Andrade, 2011; UNEP 2006). Este enfoque del

manejo de los recursos promueve la integración de todos los componentes ambientales para maximizar el bienestar social y económico sin comprometer la sustentabilidad de los ecosistemas (Aguirre Núñez, 2011; Guerrero et al., 2006; GWP, 2005).

En la República Argentina, la legislación actual sobre aguas está compuesta por la Constitución Nacional y las normas contenidas en el Código Civil, el Código de Comercio, el Código de Minería, el Código Penal, el Código Alimentario Argentino y la Ley 25675 General del Ambiente; esta última establece los presupuestos mínimos de protección ambiental. A su vez la nación ha ratificado préstamos para obras de abastecimiento de agua potable y saneamiento urbano y rural, o construcción de obras de uso múltiple cuya normativa involucra directa o indirectamente al agua (Pochat, 2005). Con la reforma de la Constitución Nacional de 1994 se introduce una disposición relativa a la pertenencia de los recursos naturales (art. 124). En tal sentido se establece que *corresponde a las provincias el dominio originario de los recursos naturales existentes en su territorio*, aunque pueda haber también poderes concurrentes, cuyo ejercicio corresponde indistinta y simultáneamente al gobierno nacional y provincial. Lamentablemente, y en ausencia de una concepción y tratamiento integral, hay muchas leyes provinciales que se refieren al agua. Esta situación genera una desarmonía entre las normas, lleva al desconocimiento de las mismas y a la intervención de una pluralidad de organismos públicos, propiciando una gestión fragmentada y sectorial de los recursos hídricos. Algunas provincias han dictado códigos de aguas, siendo la más antigua del año 1884, de la provincia de Mendoza. Son leyes que establecen principios en materia de concesiones de aguas que por el Código Civil corresponden al dominio público de ellas. Dentro de la región pampeana, solamente Córdoba cuenta con un código de aguas que indica que las concesiones deben gestionarse ante la Dirección Provincial de Hidráulica, ente registrador de los usuarios. En el caso de las aguas

superficiales, la concesión es a perpetuidad. Para el caso de las subterráneas, la concesión es eventual (no permanente) y se requiere informar las características de la perforación y los equipos previstos, la calidad y el caudal de agua extraída e identificar al técnico responsable quien debe estar inscripto en un registro especial (Formento, 1998). En 1999 se promulgó la ley 12.257 que sancionó el Código de Aguas de la Provincia de Buenos Aires, *estableciendo el régimen de protección, conservación y manejo del recurso hídrico de la provincia*. En dicho código, se prevé la formación de consorcios integrados por los beneficiarios y se reglamentan los distintos usos. En marzo de 2003 los representantes de las jurisdicciones provinciales, suscribieron el acta constitutiva del Consejo Hídrico Federal (COHIFE) como ámbito de discusión, concertación y coordinación de la política hídrica en el que participan las provincias, la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y la Subsecretaría de Recursos Hídricos. Desde su creación, este organismo desarrolla una labor de fortalecimiento del espacio institucional con activa participación de sus miembros. En septiembre de 2003, el COHIFE suscribió el Acuerdo Federal del Agua y los Principios Rectores de Política Hídrica que fueron elevados al Congreso Nacional para materializar una normativa a través de una Ley Marco Nacional de Política Hídrica coherente y efectiva (COHIFE, 2003). En ella se declara que *la autoridad hídrica nacional establecerá niveles guía de calidad de agua ambiente que sirvan como criterios referenciales para definir su aptitud en relación con los usos que le sean asignados*. Se establece en esta ley la necesidad de *asumir una estrategia integral conformada por acciones consistentes y sostenidas en el tiempo, que permitan verificar la conservación de la calidad del agua o el cumplimiento de metas progresivas de restauración de dicha calidad*. Además se contemplan programas de monitoreo y control de emisión de contaminantes,

conducentes a una gestión integrada de los recursos hídricos que minimice los conflictos relacionados con el agua.

1.2.3. Evaluación de la calidad del agua

En los últimos años, la sociedad ha tomado mayor conciencia de la necesidad de desarrollar prácticas sostenibles para la protección, la gestión y el uso eficiente de los recursos hídricos. La República Argentina se caracteriza porque aproximadamente el 75% de su territorio es árido o semiárido (con precipitaciones medias menores a 800 mm/año). Los recursos hídricos superficiales (ríos y arroyos) se encuentran distribuidos de una forma muy irregular, atendiendo a las particularidades geográficas y climáticas de cada región. El monitoreo continuo de las aguas subterráneas y superficiales para garantizar la preservación de su calidad, es una de las herramientas más poderosas de evaluación. Conocer el estado y la dinámica del recurso hídrico con precisión constituye el trabajo básico de todo proceso de planeamiento y gestión, aportando además información esencial para controlar la eficiencia y sustentabilidad de los sistemas hídricos y del conjunto de las actividades sociales y económicas relacionadas con el agua. Lamentablemente el conocimiento de la condición sanitaria de los ambientes acuáticos es incompleto y desigual, la evaluación de la calidad de las aguas dulces y el monitoreo integrado de la polución acuática se encuentra restringido tanto geográfica como temporalmente (Ferrari, 2015). Actualmente se le da prioridad a los planes de monitoreo tradicionales, donde se analizan múltiples parámetros fisicoquímicos y también bacteriológicos (Busch et al, 2016). Los índices de calidad de aguas (ICA) son una herramienta práctica que sintetiza la información proporcionada por esos parámetros (Bharti & Katyal, 2011; Bhutiani et al., 2016; Lumb et al., 2006). El

resultado es un valor único para cada sitio, que permite una interpretación de la tendencia en la calidad de un cuerpo de agua a lo largo del espacio facilitando además su comunicación (Abbasi, 2002; Ali Khan et al., 2004; Sutadian et al., 2016; Venkatesharaju et al., 2010). No obstante, esta información no es suficiente para determinar la complejidad de las interacciones entre los contaminantes y en consecuencia es necesario realizar ensayos que permitan una evaluación toxicológica integral del agua en modo sencillo, rápido y económico.

El uso de tecnologías analíticas avanzadas tales como la cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de espectrometría de masas, de gases y de absorción atómica hace que sea posible detectar una gama más amplia de contaminantes (Ju et al., 2010; Ruan et al., 2009). Aun así, estos tipos de análisis presentan ciertas limitaciones:

- Requieren un set de patrones de referencia conocidos, lo cual limita su espectro de detección. Es complejo y costoso llevar a cabo análisis cualitativos y cuantitativos de todos los posibles contaminantes.
- Los parámetros fisicoquímicos estándar de agua detectan los contaminantes medidos, pero no dan datos sobre la toxicidad total de la muestra de agua (son un buen positivo pero un mal negativo).
- No dan información toxicológica de los contaminantes presentes en el agua o de la toxicidad dada por nuevos compuestos formados a partir de la interacción de sustancias.
- En muchos casos los contaminantes asociados a las actividades antrópicas son potenciados por fenómenos naturales (por ejemplo escorrentía o lixiviación por lluvias e inundaciones). Por tanto una única medida puntual no resulta suficiente, se requiere un seguimiento temporal de las muestras de aguas para obtener un panorama de la situación ambiental.

Dado que existen falencias en la evaluación de los contaminantes y sus interacciones, lo cual es crucial para evaluar el estado ecológico acuático, se necesita una herramienta adecuada para determinar el impacto de la contaminación. Los bioensayos son un complemento a las técnicas analíticas de evaluación de calidad de aguas, aportando un dato relativo a la toxicidad de las muestras (Castillo, 2004). Esa es la razón por la cual, durante los últimos 20 años, se han desarrollado diferentes bioensayos ecotoxicológicos (que abarcan diferentes niveles de organización) para ser incluidos en los planes de monitoreo de agua y lograr esta visión integrada (De Castro-Catalá et al., 2015; Faria et al., 2007; Kuzmanovic et al., 2015; Wernersson et al., 2015; Zhang et al., 2015). En este sentido, *C. elegans* se establece como herramienta promisoría para el monitoreo de aguas en el campo de la toxicología ambiental, siendo su utilización complementaria y no sustitutiva de los índices fisicoquímicos. De esta manera, los datos de una evaluación completa e integrada de la calidad de aguas, permitirá a los organismos administradores y autoridades reguladoras contar con la información más certera para tomar decisiones en forma eficaz y coordinada, estableciendo políticas de gestión que aseguren la sostenibilidad del recurso.

1.2.4. Agricultura y calidad de agua

La agricultura es el principal usuario de recursos de agua dulce ya que utiliza un promedio mundial del 70% de todos los suministros hídricos superficiales. Esta tendencia ha sido impulsada por el crecimiento demográfico (que también ha ido acompañado de un incremento en la actividad industrial) para satisfacer las necesidades alimenticias asociadas. La productividad ha aumentado en este tiempo de manera exponencial, en respuesta a la aplicación de la tecnología moderna y a las prácticas de

manejo, basadas fundamentalmente en un paquete tecnológico que combina siembra directa y aplicación de glifosato en los cultivos transgénicos (soja -*Glycine max*- y algodón -*Gossypium* spp.- como principales; Satorre, 2005). Un mal manejo de los agroquímicos usados en las actividades agrícolas, sumado a la proximidad de los campos de cultivo a las aguas superficiales y subterráneas, podría hacer que estas sustancias llegaran hasta ellas, contaminándolas (Gunningham & Sinclair, 2005; Kolpin et al., 1998). Las características del cuerpo hídrico (superficie, profundidad y caudal) y las condiciones climáticas (temperatura, humedad, viento y régimen de precipitaciones) de cada región particular son factores que afectan a la distribución de estos productos (Kreuger, 1998; Neumann et al., 2002; Tesfamichael & Kaluarachchi, 2006). Así pues, las contaminaciones no son solo puntuales, sino que los productos químicos se distribuyen en el ambiente por medio de fenómenos como la deriva, la escorrentía superficial y el drenaje (la infiltración y la percolación), pudiéndose encontrar restos de los mismos lejos del punto de aplicación (Aparicio et al., 2013; Guzzella et al., 2006; Sasal et al., 2010; Vryzas et al., 2009). Este tipo de contaminación difusa, entre las que se cuenta el uso de agroquímicos, representa actualmente la principal causa, debido a la diversidad de compuestos que son arrastrados a los cuerpos de agua y cuyo origen, control y detección resulta dificultosa comparado con las fuentes puntuales (Baker & Hunchak-Kariouk, 2006; Carpenter et al., 1998). Además de esto, el uso continuo de estas sustancias plaguicidas aumenta la preocupación acerca del comportamiento y efectos adversos potenciales sobre los organismos (Battaglin et al., 2016; Claver, et al., 2006; Donald et al., 2007).

No obstante, se da la paradoja que la agricultura es al mismo tiempo causa y víctima de la contaminación de los recursos hídricos: es causa, por la descarga de contaminantes en las aguas superficiales y subterráneas además de la salinización y

anegamiento de las tierras de regadío. Es víctima, por el uso de aguas contaminadas, que una vez usadas en los cultivos, son susceptibles de transmitir enfermedades a los consumidores y trabajadores agrícolas.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en su Estrategia sobre los Recursos Hídricos y el Desarrollo Agrícola Sostenible y en la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Ambiente y el Desarrollo (UNCED, 1992), ha puesto de manifiesto claramente en el documento que...*deben adoptarse las medidas adecuadas para evitar que las actividades agrícolas deterioren la calidad del agua e impidan posteriores usos de ésta para otros fines*. Asimismo asienta la idea de que deben establecerse *sistemas eficaces en función de los costos que permitan supervisar la calidad del agua destinada a usos agrícolas* y trabajar en el *establecimiento de criterios biológicos, físicos y químicos de calidad del agua para los usuarios agrícolas de los recursos hídricos*.

Poniendo el foco en América latina, la degradación de la calidad del agua y la contaminación de acuíferos superficiales y subterráneos son los mayores problemas que enfrentan los recursos hídricos (UN WWDR, 2009). De hecho, la calidad de los ríos de América Latina ha empeorado de manera exponencial, desde la década de los 90. Entre las principales causas están el aumento de los vertidos residuales no tratados en las corrientes de agua dulce y las prácticas no sostenibles de uso del suelo que incrementan la erosión y conducen a un aumento de las cargas de abonos y sedimentos.

En Argentina los datos reportados en los últimos años de contaminación de aguas, indican un porcentaje significativo de casos en zonas agrícolas del país, originados por una continua urbanización asociada a una expansión industrial que ha conducido a descargas industriales y domésticas no controladas y al empleo inapropiado de productos agroquímicos en las zonas rurales o mixtas, afectando la salud, la producción

de alimentos y el desarrollo socio-económico. Se han reportado datos del impacto de la agricultura sobre el ambiente a escala regional (Rabinovich & Torres, 2004; Viglizzo et al., 2001, 2011), aunque no hay reportes de literatura sobre un impacto a escalas superiores. Son escasos los estudios que hablen de contaminación de aguas superficiales por plaguicidas (Chagas et al., 2014; De Gerónimo et al., 2014; Kraemer et al., 2014; Mugni, 2008; Paracampo et al., 2012). Ciertos autores han demostrado la presencia de agroquímicos en aguas subterráneas así como la sobreexplotación de acuíferos (Calcaterra et al., 2011). Si bien se han hecho experimentos de simulación de redes tróficas (mesocosmos) para la determinación de efectos biológicos de agroquímicos en organismos no blanco (Bricheux et al., 2013; Vera et al., 2010), hasta ahora no se han realizado estudios en el país que integren relevamientos de presencia de estas sustancias en aguas superficiales en conjunto con ensayos de toxicidad. Por ello, realizar una evaluación integrada y permanente de la calidad del recurso hídrico y establecer relaciones causa-efecto en zonas de intensa actividad agrícola (e industrial), se hace imprescindible.

Por esa razón, en este trabajo de tesis los ensayos de toxicidad se realizaron en dos sistemas de cuencas hídricas (una de llanura en la región pampeana y otra de montaña en la provincia de Mendoza) que abarcan ambientes agrícolas, urbanos e industriales.

1.3. Glifosato

1.3.1. Formulaciones comerciales de glifosato

El glifosato (N-fosfonometil-glicina $C_3H_8NO_5P$; Fig. 1.4.) es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, post emergente, ampliamente usado en la agricultura para

el control de malezas anuales, perennes, mono o dicotiledóneas que compiten con los cultivos por recursos como la luz, el agua y los nutrientes (Martino, 1995, 1997; Rodrigues & Almeida, 1995).

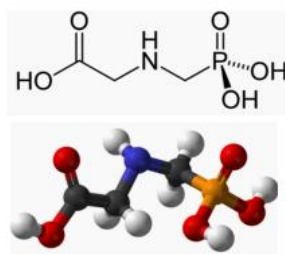


Figura 1.4. Estructura química y modelo de enlaces del glifosato.

El glifosato es absorbido por las plantas, en las que se acumula preferentemente en los tejidos metabólicamente activos como son los meristemáticos. Allí se une e inhibe a la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), bloqueando de esta forma las rutas metabólicas que llevan a la producción de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) utilizados en la síntesis de proteínas (Roberts et al., 1998). La EPSPS está presente en plantas y microorganismos, tales como bacterias y hongos, y ausente en animales y humanos.

Las formulaciones comerciales más usadas contienen el surfactante polioxietileno amina (POEA), ácidos orgánicos de glifosato relacionados, isopropilamina y agua (Fig. 1.5.). El POEA (sustancia derivada de ácidos sintetizados de grasas animales) es un detergente que facilita la penetración del glifosato en las células vegetales y mejora su eficacia, dado que el principio activo *per se* no es capaz de atravesar las cutículas foliares y membranas celulares hidrofóbicas de las malezas (Franz et al., 1997; Martino, 1995).

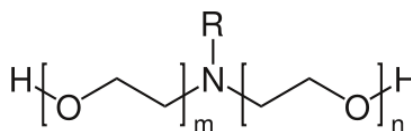


Figura 1.5. Estructura química de la polioxietilamina (POEA).

1.3.2. Comportamiento y persistencia

Actualmente el glifosato es el herbicida de mayor uso en el sistema de cultivo extensivo y uno de los más frecuentemente utilizados a nivel mundial en forestación, control de malezas acuáticas y agricultura, particularmente en el sistema de siembra directa (Martino, 1995, 1997).

Con respecto al suelo, es adsorbido fuertemente a las partículas del mismo, a pesar de su elevada solubilidad ($10,5 \text{ g L}^{-1}$) (Prata et al., 2000). Se ha demostrado que el C_{14} de este herbicida se adsorbe más fácilmente en un suelo arcillo-limoso que en uno arcillo-arenoso (Sprankle et al., 1975). Por tanto, las diferencias en las características fisicoquímicas juegan un rol esencial en su adsorción: en particular su pH y su tenor de Fe, Al, Ca, P_2O_5 (Dong-Mei et al., 2004; Maqueda et al., 1998). Respecto a la materia orgánica, varios autores reportaron que está inversamente relacionada: el glifosato compite con la misma por los sitios de adsorción en los minerales arcillosos y los óxidos de Fe y Al (Gerritse et al., 1996). Varios investigadores afirman que puede ser fácilmente desorbido en algunas clases de suelo, liberándose de las partículas y movilizándose en el mismo. En Europa de hecho se vio que el 80% del glifosato adicionado se liberó en un período de 2 h (Piccolo et al., 1994). Una vez liberado, es rápidamente degradado de manera natural por los microorganismos (Dong Mei et al., 2004; Glass, 1987), siendo este mecanismo una de las formas más importantes de

eliminación (Araújo et al., 2003). El producto de su biodegradación es el ácido aminometil fosfónico, comúnmente conocido como AMPA (Fig 1.6.).

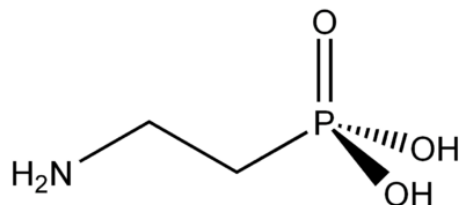


Figura 1.6. Estructura química y modelo de enlaces del AMPA.

En relación al agua, este herbicida se encuentra en la lista de los principales contaminantes (Séralini, 2015). Los residuos de glifosato y sus metabolitos pueden encontrarse en aguas superficiales cuando se aplica cerca de sus cursos, por efecto de la deriva. Por otra parte, sabemos que muchas veces las aplicaciones se realizan mediante pulverizaciones aéreas lo que puede incrementar su dispersión. La escorrentía es otro de los mecanismos que influyen en la movilidad del producto, sea disuelto en agua o adsorbido a las partículas en suspensión. En este sentido, Aparicio et al. (2013) señalan que la presencia de glifosato y AMPA es más frecuente en la materia particulada y sedimentos que en el cuerpo de agua en sí; aunque no hay muchos estudios en los que se hayan investigado las diferentes matrices ambientales (sedimento y agua principalmente) destino de estas sustancias. Humphries et al. (2005) llevaron a cabo un monitoreo de aguas superficiales de humedales y arroyos en la zona de Alberta, Canadá, encontrando glifosato en 8 de los 13 sitios y en el 22% de las muestras tomadas, con una concentración pico de $6,07 \mu\text{g L}^{-1}$. Otro estudio realizado con el formulado comercial Roundup[®], utilizado para el control de malezas en la Reserva Natural de humedales subtropicales de Mai Po (Hong Kong), concluyó que el formulado fue rápidamente

transportado por la corriente de agua, detectándose grandes cantidades del herbicida en aquellas zonas que no recibieron aplicación del producto (Tsui & Chu, 2008).

1.3.3. Toxicidad

La toxicidad del glifosato fue evaluada por primera vez por la FAO en conjunto con la Organización Mundial de la Salud, OMS (WHO, 1986), estableciendo la ingesta diaria admisible (ADI) para el glifosato en $0\text{-}1\text{ mg Kg}^{-1}$ de peso corporal, en base a un nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) de 100 mg Kg^{-1} de peso corporal por día en bioensayos crónicos de toxicidad y carcinogenicidad en ratas. Bajo este fundamento, tanto la OMS como la EPA clasificaron los herbicidas con base de glifosato como Clase III (levemente tóxico) para exposiciones orales e inhalación y en Clase I (severa) para exposición ocular (EPA, 1993). Según el criterio de la EPA, considerando las condiciones de uso presente y esperado, no hay potencial riesgo del herbicida para la salud. Sin embargo, un estudio ha demostrado que las formulaciones y productos metabólicos del glifosato comercial, sal de isopropilamina (como el Roundup®) causan la muerte de embriones, placentas, y células umbilicales humanas *in vitro* (Benachour & Seralini, 2009). En la Unión Europea, la última revisión de este herbicida fue hecha por la Comisión Europea, concluyendo que no existen efectos adversos en la salud humana o animal tras la exposición a los formulados con este herbicida (EC, 2002). No obstante, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer en 2015 clasificó al glifosato como probable carcinógeno para los seres humanos (grupo 2A) (IARC, 2015). En Argentina, según la Resolución 350/99 (SENASA, 2015), su principio activo está dentro del grupo de activos de improbable riesgo agudo. Tanto el glifosato como los herbicidas formulados a partir de ese principio activo están clasificados en la categoría

de menor riesgo toxicológico (Clase IV o banda verde), es decir, productos que normalmente no ofrecen peligro, según el criterio adoptado por la OMS y la FAO.

Respecto a la toxicidad ambiental, diversos autores han investigado el impacto de fórmulas comerciales de glifosato como causante de daños (Newman et al., 2016; Pizarro et al., 2016; Reno et al., 2014; Salazar-López & Madrid, 2011). Existen datos que demuestran los efectos del estrés oxidativo provocado por glifosato comercial (Roundup®) y la mayoría tiene que ver con exposiciones agudas (Guilherme et al., 2010, 2012a, 2012b). Ciertos autores reportaron que los efectos no provienen de su componente activo, el glifosato, sino del surfactante POEA (Burger & Fernández, 2004; El-Shenawy, 2009; Moore et al., 2012; Tsui & Chu, 2003). Según Bozzo (2010) el POEA es extremadamente tóxico para los organismos de ambientes acuáticos, como disruptor respiratorio; inhibió el crecimiento del macroinvertebrado *Daphnia magna* y causó efectos similares en otros organismos acuáticos (Brausch et al., 2007). Otros autores, sin embargo, no encontraron una relación directa entre la toxicidad de diferentes formulados de glifosato y la presencia o no del surfactante (Sihtmäe et al., 2013). La evaluación de la toxicidad aguda de dos herbicidas comerciales formulados con glifosato, usando peces de la especie *Poecilia reticulata* reveló mortalidad del 100 % de los especímenes a 100 µl L⁻¹ de una de las sustancias (equivalente a 48 mg L⁻¹ de principio activo) y a 50 µl L⁻¹ de la otra (equivalente a 24 mg L⁻¹ de principio activo). Con *C. elegans* se han llevado a cabo ensayos *in vitro* de exposición a glifosato, evaluando diferentes parámetros. Ruan et al. (2009) encontraron una reducción en el movimiento de la cabeza del nematodo y un aumento en el tiempo de alcance de la edad reproductiva tras la exposición a una concentración de 0,007 mg L⁻¹ del herbicida. Negga et al. (2012) señalaron neurodegeneración en individuos expuestos a concentraciones subletales del herbicida. En otros informes se exploraron los efectos de

la mezcla de dos pesticidas en el nematodo (uno de ellos el glifosato), utilizando una variedad de enfoques diferentes (Gomez-Eyles et al., 2009; Negga et al., 2011; Viñuela et al., 2010). Recientemente también se reportaron daños en el sistema nervioso y más concretamente en la morfología neuronal de individuos de *C. elegans* expuestos a glifosato (McVey et al., 2016).

Concerniente a aguas, los límites máximos permisibles para exposiciones a glifosato a corto y largo plazo son 2,7 y 0,8 mg L⁻¹ respectivamente, de acuerdo a las directrices de calidad de agua para la protección de la vida acuática del Consejo Canadiense de Ministros del Ambiente, CCME (Statistics Canada, 2014). Para agua de consumo humano, la EPA establece el límite para la presencia de glifosato en 0,9 mg L⁻¹ (900 ppb) y como dosis de referencia 2 mg Kg⁻¹ por día. La ley Argentina de residuos peligrosos (Ley 24051/92) sin embargo, fija un máximo de 0,28 mg L⁻¹; es la Unión Europea la que fija un máximo más restrictivo, de 0,1 µg L⁻¹. Contrariamente al caso del glifosato, para AMPA no existe una regulación relativa a los límites permisibles a pesar de que hayan sido reportados sus efectos tóxicos (Daouk et al., 2013; Domínguez et al., 2016).

1.3.4. Marco legal de productos fitosanitarios. Registro e instrumentos regulatorios

El área de registro y manejo de plaguicidas de la FAO tiene por objetivo introducir prácticas agrícolas sostenibles para reducir los riesgos para la salud y el ambiente asociados con el uso de plaguicidas. El Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas (CoC) es un documento internacional orientativo sobre el manejo de plaguicidas para el público y las entidades privadas

involucradas en la distribución y uso de plaguicidas. Fue incluido en 1985 por la Conferencia de la FAO y desde entonces ha sido la norma aceptada en todo el mundo para el manejo de plaguicidas. En él se establece el concepto de *ciclo de vida* del manejo de los plaguicidas, que aborda todos los aspectos principales relacionados con el desarrollo, reglamentación, producción, gestión, envasado, etiquetado, distribución, manipulación, aplicación, uso y control de todo tipo de plaguicidas, incluidas las actividades posteriores a su registro y la disposición final de estos productos y de sus envases. El CoC está destinado a utilizarse como base dentro del contexto de la legislación nacional. En la República Argentina, el manejo de los plaguicidas está reglamentado en distintas normativas emanadas del Ministerio de Agroindustria a través de la Dirección de Agroquímicos y Biológicos (DIRABIO) del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina (SENASA). La autorización de los mismos se desarrolla en el marco de un proceso de calidad que determina que el producto no implique riesgos. El registro es obligatorio, con una revisión periódica de los productos y un seguimiento permanente de los posibles efectos de los agroquímicos en el ambiente y en la salud humana.

Se presenta un cuadro resumen con la normativa internacional vigente en materia de agroquímicos (Apéndice 1), la normativa nacional ambiental y demás normas que rigen el uso y comercialización de plaguicidas en el país (Apéndice 2).

1.3.5. Uso del glifosato en Argentina

Debido a que la producción agrícola en Argentina se basa fundamentalmente en la combinación de la siembra directa y cultivos transgénicos resistentes a glifosato, este herbicida pasa a ser el más empleado, aplicándose de 180 a 200 millones de litros cada

año (Aparicio et al., 2013). En el 95% de los lotes que se manejan con siembra directa se usa glifosato en algún momento del ciclo, particularmente, en la etapa de barbecho químico o aún en pre-siembra (Argenbio, 2016). Sumado a esto, con la aparición de malezas resistentes al herbicida en los cultivos, se comenzaron a incrementar tanto las dosis totales por año como la frecuencia de las aplicaciones. Por tanto, el mayor uso de agroquímicos asociados con el proceso de agriculturización y cambios en los patrones de aplicación, representa riesgos de contaminación y de toxicidad que deben ser detectados ya que pueden afectar tanto a la salud humana como al ambiente. Sin embargo, no se han realizado demasiados estudios de seguimiento para evaluar los posibles efectos del herbicida sobre el ecosistema. La mayor parte de ellos se ha centrado en suelos más que en ambientes acuáticos (Maitre et al., 2010; Lorenzatti et al., 2004; Lupi et al., 2015). Entre los trabajos con muestras ambientales de agua, se destaca el de Peruzzo et al. (2008) que llevaron a cabo un completo estudio en aguas superficiales y suelos de la región de Pergamino-Arrecifes, demostrando una mayor deriva del glifosato debido a las precipitaciones y la lixiviación de partículas de suelo a las que se asocia el herbicida, derivadas por escorrentía. Ronco et al. (2016) analizaron el contenido de glifosato y AMPA en muestras de aguas y sedimentos del río Paraná; De Gerónimo et al. (2014) estudiaron la presencia de diferentes plaguicidas, entre ellos glifosato, comparando entre cuatro cuencas del país. Paravani et al. (2016) llevaron a cabo un estudio en el que se determinó la concentración de glifosato en aguas del río Paraná.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Para hacer frente a la creciente demanda de alimentos de la población mundial se requiere aumentar los rendimientos agrícolas. Este escenario plantea al sector agropecuario la necesidad de emplear, entre otras alternativas, compuestos químicos capaces de eliminar o controlar en modo eficaz las malezas, insectos y organismos patógenos que afectan a los cultivos comerciales. Si bien a lo largo de las décadas la industria de los agroquímicos ha evolucionado y se han ido seleccionando aquellos compuestos que poseen baja toxicidad, con el mínimo impacto en el ambiente, es necesaria la evaluación toxicológica integral del efecto de estos productos a largo plazo. La realización de este tipo de estudios presenta el siguiente dilema: por un lado la complejidad de los productos químicos de las muestras ambientales para poner a prueba, evaluar su acción y comprender cómo afectan los mecanismos moleculares en los organismos superiores. Por otro lado, la limitación de recursos y los problemas éticos asociados a los ensayos tradicionales con mamíferos. De hecho, cada vez son más los países que se adhieren a las iniciativas de distintos organismos internacionales de reducir, mejorar o sustituir a estas especies en las pruebas toxicológicas, con métodos de ensayo y modelos alternativos.

En este sentido se ha determinado que uno de los organismos modelo ideal para hacer frente a los desafíos actuales de los campos de la toxicología molecular y ambiental es el nematodo *Caenorhabditis elegans*.

El objetivo general de esta tesis es utilizar el nematodo *C. elegans* como herramienta integral para evaluar la calidad del agua, considerando diferentes

condiciones ambientales y actividades antrópicas tales como la agricultura, industria y generación de residuos urbanos.

La hipótesis principal de la investigación se establece como: *Caenorhabditis elegans* es una herramienta toxicológica ambiental válida y complementaria en la evaluación integral de la calidad de aguas.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Estudio del efecto de la exposición de un formulado comercial de glifosato sobre distintos aspectos de *C. elegans*:

A.1) El ciclo de vida del nematodo: puesta a punto del bioensayo.

A.2) La inducción de la respuesta a estrés oxidativo.

A.3) La expresión de genes de catalasa y su actividad.

2. Caracterización de muestras de aguas en dos cuencas representativas de la República Argentina: río Pergamino y río Tunuyán.

B.1) Análisis fisicoquímico.

B.2) Análisis bacteriológico (río Tunuyán).

B.3) Determinación de la concentración de glifosato y su metabolito (Pergamino).

B.4) Construcción de un Índice de Calidad de Aguas.

3. Estudio del efecto de la contaminación en aguas.

C.1) Calidad del agua y crecimiento del nematodo: valoración del estado toxicológico de las muestras.

C.2) Análisis de la relación de la calidad de agua y el crecimiento relativo de *C. elegans*.

C.3) Construcción de un índice de categorización de efectos tóxicos en muestras de agua a partir de los valores de crecimiento relativo de *C. elegans* (cuenca de Pergamino).

1.5. Contenido

El contenido de la tesis se ha organizado de la manera siguiente:

Un primer capítulo (Capítulo 1) de introducción sobre los aspectos generales del estado del arte de *C. elegans* como organismo modelo, manejo ambiental del recurso hídrico y del herbicida glifosato, además de presentación de los objetivos de la tesis.

A lo largo del capítulo 2 se describen los materiales y metodologías utilizadas y el abordaje experimental elegido, que son comunes a los 3 capítulos siguientes, en los que se exponen resultados. En cada uno de ellos, hay una introducción relativa a la temática que aborda y presentación de los objetivos específicos. Más concretamente, el capítulo 3 aborda el estudio de la respuesta de *C. elegans* tras la exposición a glifosato. En el capítulo 4 se exponen los resultados de los análisis llevados a cabo en la zona de Pergamino, en la región Pampeana: caracterización de aguas y evaluación de la toxicidad. En el capítulo 5 se exponen los resultados del análisis espacio temporal de la cuenca del río Tunuyán en Mendoza, donde se usa a *C. elegans* como herramienta toxicológica integrada.

Por último, el capítulo 6 se hace una exposición de las conclusiones generales, sintetizando los hallazgos principales y el aporte de esta tesis al conocimiento. También se presentan las posibles líneas futuras a partir de los resultados de esta investigación.

CAPÍTULO 2.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Capítulo 2. Materiales y metodología

2.1. Mantenimiento y procesamiento de *C. elegans*

2.1.1. Medios de cultivo para el nematodo y *E. coli*

La cepa utilizada fue la N2 de *C. elegans* var. Bristol, obtenida del CGC, crecida y mantenida en placas de Petri a 15-20 °C con un medio de cultivo sólido estandarizado para nematodos (NGM) (compuesto por litro: 17 g agar, 2,5 g bactopectona y 3 g NaCl con la adición, después de la esterilización en autoclave, de: 1 mL 1M CaCl₂, 1 mL 1M MgSO₄, 25 mL 1 M KH₂PO₄, y 1 mL de una solución que contiene 5 g L⁻¹ de colesterol, preparado en etanol). Se dispuso el medio NGM en placas de 60 mm de diámetro y, justo antes del vertido, se le agregó: Estreptomicina 1000x y Nistatina 100x (Caldicott et al., 1994). Las placas se conservaron en la heladera a 4 °C en un recipiente hermético hasta su uso.

Las bacterias usadas como fuente de alimento para *C. elegans* fueron *E. coli* de la cepa OP50-1 que se hicieron crecer en un medio LB agar (10 g bactotripton, 5 g bactolevadura, 5 g NaCl, 15 g agar, H₂O destilada hasta 1 L, pH 7,5) a 20 °C (Kaletta & Hengartner, 2006). Con el ansa se pasó una de las colonias aisladas en la placa y en condiciones de asepsia se inoculó un medio LB líquido (10 g de bactotripton, 5 g bactolevadura, 5 g NaCl, H₂O destilada hasta 1 L, llevado a pH 7 utilizando 1 M NaOH y se incubó a 37°C con agitación durante 12 h. En condiciones de esterilidad se aplicaron aproximadamente 0,05 mL de cultivo líquido de *E. coli* a placas con NGM; se cuidó de no propagar la bacteria hasta los bordes de la placa para que los nematodos no

queden adheridos en esa zona, se deshidraten y mueran. Se dejó secar el césped de bacteria durante toda la noche a 20 °C (Brenner, 1974).

Para la sincronización (ver apartado siguiente) se utilizó M9 (3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl, 1 Ml 1M MgSO_4 añadido después de autoclavar, H_2O hasta 1 L) y solución de blanqueamiento alcalino (3,5 mL M9, 1 mL lavandina 30%, 0,5 mL 5M NaOH). Para el crecimiento en medio líquido se utilizó medio S (S Basal 100%, citrato de potasio 1%, solución 1%, 1M CaCl_2 0,3%, 1M MgSO_4 3%) con agitación a 150 rpm.

Los componentes de los medios mencionados se describen a continuación:

- Medio tampón KPO_4 (1 L): 108,3 g KH_2PO_4 ; 35,6 g K_2HPO_4
- Colesterol (50 mL): 250 mg colesterol; etanol 95%
- S Basal (1 L): 0,85 g NaCl; 1 mL colesterol (5 mg mL^{-1}); 1 g K_2HPO_4
- Medio citrato de potasio 1M (1 L): 20 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$; 293,5 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{K}_3\text{O}_7$.

2.1.2. Sincronización de los nematodos

Para la realización de los ensayos experimentales, se sincronizó previamente la población de nematodos en el mismo estadio de desarrollo, utilizando el método de lavandina (Kaletta & Hengartner, 2006). Para este procedimiento se lavaron los gusanos hermafroditas adultos (con huevos) de la placa, con 1 mL de M9, aspirando y expulsando con la micropipeta (P1000) para despegarlos. Se transfirió el colectado a un microtubo de 2 mL (cargando el contenido de no más de dos placas por microtubo). Se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min y se deseó el sobrenadante. Después se agregó 1 mL de M9 y se centrifugó de nuevo a 3000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se agregó 400 mL de blanqueamiento alcalino (apartado 2.1.1.) para

matar a los nematodos grávidos y disolver su cutícula; de esta manera los huevos, que son resistentes a esta solución, quedan dispersos en la misma. Se agitó con la mano por 4 min. Se realizaron dos/tres lavados con 1 mL de M9 estéril cada vez. Se centrifugó a 2000 rpm durante 20 s entre cada lavado. Se descartó el sobrenadante. El último centrifugado se hizo a 11000 rpm durante 2 min, para romper los huevos, comprobando que no hubiese finalmente olor a lavandina. Seguidamente se resuspendió en el mismo microtubo de 1,5 mL, en 900 µL de M9 estéril y se colocó en un rotor en agitación durante 12 h a 21 °C, para la eclosión de las larvas L1, que fueron transferidas al día siguiente a placas con césped de bacterias.

2.1.3. Conservación y recuperación de *C. elegans*

Los nematodos se mantuvieron a corto plazo en las placas NGM con césped de bacteria a 20 °C. Para su conservación a largo plazo fueron congelados. Para ello, a los L1 sincronizados y mantenidos en medio líquido S basal, se les añadió solución de congelación (Brenner, 1974), un medio líquido compuesto por:

- Medio tampón S: 129 mL 0,05 M K_2HPO_4 ; 871 mL 0,05 M KH_2PO_4 ; 5,85 g NaCl)
- 30 % de glicerina (v/v) (autoclave)

Se mezcló bien y se dispusieron en alícuotas de 1 mL en tubos criogénicos de 1,8 mL con rosca interna, empacados en una caja de espuma de poliestireno con ranuras para la separación, etiquetados con el nombre de la cepa y la fecha. Se les aplicó un enfriamiento gradual hasta -80 °C (Kaletta & Hengartner, 2006). Para la recuperación de los nematodos, se descongelaron los viales gradualmente y a temperatura ambiente,

en un recipiente con hielo hasta su derretimiento total. Se pasaron después a una placa con medio NGM sembrada con bacteria.

2.1.4. Transferencia y esterilización del nematodo en placas

El nematodo adulto alcanza aproximadamente 1 mm de longitud, por lo que no es posible distinguirlo a simple vista. Se utilizó una lupa Nikon 3X (magnificación total 5X a 20X).

Se emplearon dos técnicas para transferir los nematodos de una placa a otra:

- Fragmentación o corte de un trozo de agar de la placa y apoyarlo boca abajo sobre otra, ya sembrada con bacterias. Los gusanos empezarán a distribuirse en esta nueva placa.
- Utilización de un ansa de platino para recuperar los nematodos individualmente.

La transferencia de nematodos suele hacerse cada 2 o 3 días, para no saturar las placas de individuos.

Esporádicamente las placas de *C. elegans* pueden contaminarse con hongos u otras bacterias que no son las utilizadas normalmente como alimento. Generalmente no dañan al nematodo, pero podrían dificultar su visualización y alterar su fisiología, por lo tanto las placas deben mantenerse limpias (Stiernagle, 2005). Se utilizó el método de descontaminación en placa, usando 5N NaOH y lavandina doméstica (solución al 5% de lavandina). Se hizo una mezcla 1N NaOH: lavandina (1:1) y se puso una gota de esta solución en el borde de una placa de NGM sembrada con *E. coli*. Con un ansa, se colocaron varios hermafroditas grávidos en la gota, de tal manera que la solución mató a

los contaminantes y a los hermafroditas, secándose antes de que eclosionen los huevos y nazcan los embriones L1.

2.2. Bioensayos con *C. elegans*

2.2.1. Efecto crónico del glifosato comercial sobre el ciclo de vida del nematodo

Para estudiar la respuesta del nematodo al glifosato comercial, se realizó un test de toxicidad crónica siguiendo la metodología descrita por Höss et al. (2013) con pequeñas modificaciones y acorde a métodos estándar (ISO, 2010). Se expusieron 10 L1 a concentraciones crecientes (0; 0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,25; 1,75; 2,25; 5; 7,50 y 10 mg mL⁻¹) de la formulación de glifosato (Roundup® Ultra, distribuido por Monsanto) a una concentración de 480 g L⁻¹ en M9 suplementada con *E. coli* (la concentración final de bacteria fue de 1 unidad de densidad óptica a 600 nm) en un volumen final total de 0,5 mL y se incubaron durante 96 h a 20 °C. Se hizo un control negativo con medio M9 y un control positivo del formulado de glifosato a una concentración de 2,5 mg mL⁻¹. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado en placas de cultivo de 24 pocillos (de 1,5 mm de diámetro cada uno). Transcurrido el tiempo, se detuvo el crecimiento de los nematodos por calor (20 min a 50 °C), se tiñeron por el agregado de 0,25 mL de solución de Rosa Bengala (0,5 g L⁻¹) y se almacenaron a 4 °C hasta la realización de las mediciones.

2.2.2. Ensayos con aguas

El bioensayo de aguas con *C. elegans* se desarrolló de acuerdo a métodos estándar, con algunas modificaciones (Höss et al., 2009; ISO, 2010). El parámetro usado para determinar la toxicidad fue la medición de la longitud corporal del gusano adulto (Höss et al., 2012; Traunspurger et al., 1997).

Se incubaron 10 L1 con la muestra ambiental de agua colectada suplementada con *E. coli* (la concentración final de bacteria fue de 1 unidad de densidad óptica a 600 nm) en un volumen final total de 0,5 mL, durante 96 h a 20 °C. Al igual que en los ensayos con glifosato, se hicieron dos controles: uno con medio M9 y otro con glifosato a una concentración de 2,5 mg mL⁻¹. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado (tanto las aguas como los controles) en placas de cultivo de 24 pocillos, de 1,5 mm de diámetro cada uno (Fig. 2.1.). Después de 96 h de incubación a 20°C, el bioensayo se detuvo mediante calor (20 min a 50 °C), se tiñeron por el agregado de 0,25 mL de solución de Rosa Bengala (0,5 g L⁻¹) y se almacenaron a 4 °C hasta la realización de las mediciones.

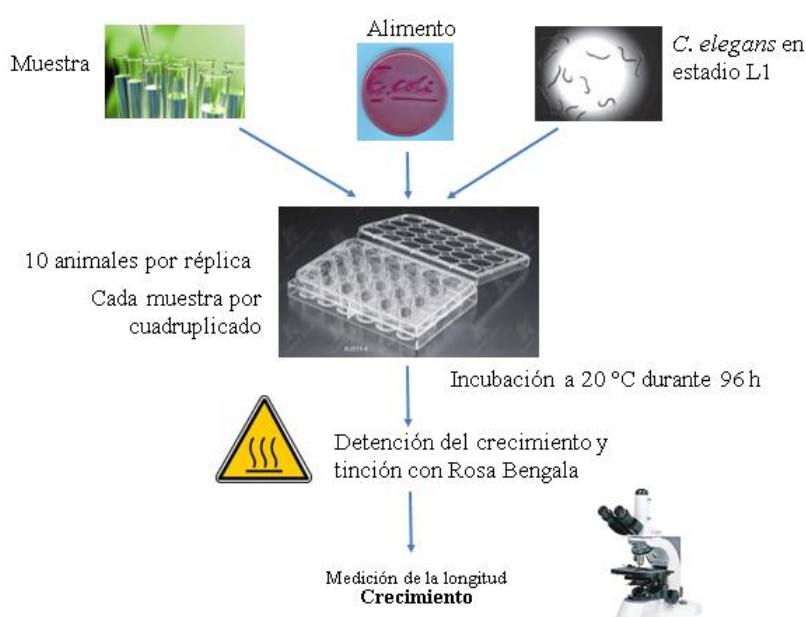


Figura 2.1. Bioensayo con *C. elegans*, de acuerdo con métodos estándar.

2.3. Análisis de crecimiento, fertilidad y reproducción de *C. elegans*

Los nematodos que han sido usados en el bioensayo (tanto en el caso del glifosato como con muestras ambientales de agua) ya teñidos, como se ha explicado anteriormente, fueron transferidos desde las placas de ensayo a cápsulas de Petri con medio tampón M9 (1000 μ L para evitar la deshidratación) utilizando una pipeta Pasteur. Las muestras fueron fotografiadas utilizando un microscopio óptico Nikon Eclipse 50i a 40X de aumento (o 100X para gusanos en estadio L1), con una cámara digital acoplada Nikon CoolPix S10. A continuación, se midió la longitud del cuerpo a lo largo de su eje utilizando el software ImageJ (Schneider et al., 2012). Se calculó la media de los L1 que fue de $221 \pm 20 \mu\text{m}$ ($n = 30$). Con este dato se estimó el crecimiento, como la diferencia entre la longitud medida tras el ensayo (en μm) y la longitud promedio al inicio (media de L1). Los resultados se expresaron como crecimiento relativo al control (en medio M9) de cada experimento (Höss et al., 2009; ISO, 2010). La longitud del cuerpo en los controles con M9 al término del bioensayo varió entre $1200\text{-}1300 \pm 10 \mu\text{m}$. Para el análisis de la fertilidad, se contabilizó en el microscopio, a 40X de aumento, el número de grávidos respecto al total de adultos; considerando al animal como grávido cuando presentó uno o más huevos dentro del cuerpo. La reproducción de los nematodos se obtuvo dividiendo el número total de L1 (descendencia) después del bioensayo entre el número de animales que han llegado a adultos. Se expresaron los tres parámetros como porcentaje de los valores medios para cada concentración, respecto a los obtenidos para el control en M9 (ISO, 2010).

En los bioensayos llevados a cabo para las muestras ambientales de agua de las dos cuencas, se eligió solo el crecimiento relativo como parámetro a analizar.

2.4. Detección de especies reactivas del oxígeno (ERO)

Se utilizó 2',7' dicloro - dihidro - fluoresceína diacetato (H_2DCFDA) suministrado por Sigma-Aldrich Chemical Company® para visualizar de manera cualitativa la producción de ERO intracelular en estadio L4 con glifosato (1 mg mL^{-1}), paraquat ($0,5\text{ mg mL}^{-1}$) o con M9 (control), y suplementada con *E. coli*. La concentración final de bacteria por pocillo fue de 1 unidad de densidad óptica a 600 nm. El paraquat se usa como control por ser un potente inductor de estrés oxidativo ampliamente estudiado; se eligieron ambas concentraciones por ser subletales (Al-Sarar, 2015; Fathi et al., 2015; Ranjbar, 2014). Los L4 se obtuvieron a partir de L1 sincronizados como se ha descrito anteriormente. Se trataron durante 16 h (toda la noche) a 20°C ; tras este periodo los nematodos se recolectaron de los pocillos y se lavaron cinco veces con M9. Se incubaron posteriormente en oscuridad con 25 mM de H_2DCFDA en 250 μL de M9, durante 30 min a 20°C (LeBel et al., 1992; Oyama et al., 1994). Después de la tinción, se lavaron tres veces con M9 y fueron preparados con medio tampón fosfato salino (NaN_3 25 mM) para su visualización, con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 50i. La intensidad de la fluorescencia se midió a 530 nm. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital Nikon CoolPix S10 y son representativas de 50 nematodos procedentes de un ensayo que a su vez es representativo de 3 ensayos independientes (se repitió 3 veces en el tiempo).

2.5. Extracción de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR)

Se trataron 4000 nematodos en estadio L4 con glifosato (1 mg mL^{-1}), paraquat ($0,5\text{ mg mL}^{-1}$) o con M9 (control), y suplementado con *E. coli*. La concentración final

de bacteria por pocillo fue de 1 unidad de densidad óptica a 600 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado en placas de cultivo de 24 pocillos y se incubaron durante 16 h a 20 °C. Transcurrido este tiempo, se recolectaron y lavaron cinco veces con M9, se transfirieron a un microtubo de 2 mL, se resuspendieron en 500 µl de reactivo Trizol® y se mantuvieron a -80 °C hasta su uso posterior. El ARN total fue aislado por el método reactivo de Trizol de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). La síntesis de cDNA se realizó a través de la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, Reino Unido). Se añadió 1 µL del cDNA resultante para la realización de la RT-PCR, utilizando el Fast-Plus EvaGreen® Master Mix (Biotium, EE.UU.) y un sistema para RT-PCR de Applied Biosystems 7500. Las secuencias de oligonucleótidos de todos los cebadores fueron diseñadas (Romanowski et al., 2012) basándose en las de *www.wormbase.org* (Cuadro 2.1.) usando el software Primer 3 Plus (Untergasser et al., 2007) y cotejados para especificidad utilizando NCBI BLAST (Johnson et al., 2008). Los cebadores fueron comprados a Invitrogen. La expresión de los genes relacionados con el estrés oxidativo se evaluó en relación al control sin tratamiento de herbicida y un transcripto estable, *cdc-42*, utilizado como gen de referencia (Hellemans et al., 2007; Hoogewijs et al., 2008). Los resultados representan la media de tres réplicas (de 4000 nematodos cada una). El ensayo se repitió 3 veces en el tiempo para demostrar la reproducibilidad de la prueba, con muestras biológicas independientes. Los datos presentados pertenecen a uno de ellos.

Gen	Descripción	Secuencia cebador directo	Secuencia cebador reverso
gsr-1	Glutación reductasa	CGGAAAAGACGAGAAAAGTCG	TTATTCCGGCTTCACACCTC
gpx-7	Glutación peroxidasa	ACAGGGTGGAACCTCTTTTCG	GTTTGTCGACGGACCAAATC
gst-36	Glutación S-transferasa	AGGCAATTCGTCTGCTCTTC	CGAGCGATTGCTGTAGTTTG
gst-28	Glutación S-transferasa	CGCTGGAAAATCTCAGGAAG	AATGTCCGCGAAGGTGATAC
sod-3	Superóxido dismutasa	TCGGTTCCTGGATAACTTG	AAGGATCCTGGTTTGCACAG
ctl-1	Catalasa	ACTGAAAACCTACAAGGAGACG	GCGACCGTTGAAAAACGAACG
ctl-2	Catalasa	ACTGAAAACCTACAAGGAGACG	GTGTGGCGGATCCGCTC
ctl-3	Catalasa	CACAAAACCCGGACCAATGG	GCGACCGTTGAAAAACGAACG
trxr-1	Tiorredoxina reductasa	ACGATTGGTGTGCGAAAGAGC	TCAGGTGTTCCCTCCAAAAC
trxr-2	Tiorredoxina reductasa	CGGGAAAGAGCTAAAACACG	ATCCACAAACTCGGCATAGG
prdx-2	Peroxisredoxina	CAACCGAGATTATCGCCTTC	TGTCAGCGAGAACTGGAATG
cdc-42	Gen de referencia	CTGCTGGACAGGAAGATTACG	CTCGGACATTCTCGAATGAAG

Cuadro 2.1. Cebadores utilizados. El sentido de las secuencias es 5' a 3'.

El sistema StepOne (Applied Biosystems) fue utilizado para realizar las reacciones de RT-PCR. Los resultados fueron cuantificados usando el software LinReg PCR (Ruijter et al., 2009) para determinar los ciclos umbrales de cada reacción. Posteriormente fueron analizados utilizando el método descrito por Pfaffl (Hellemans et al., 2007; Pfaffl, 2001).

2.6. Cuantificación de la actividad catalasa

Se tomaron muestras de 4000 nematodos tratados con 1 mg mL⁻¹ del glifosato comercial ya mencionado, durante 16 h (toda la noche) a 20°C. Como control positivo de inducción, se trataron los animales con paraquat dicloruro a una concentración de 0,5 mg L⁻¹ el mismo tiempo y en las mismas condiciones. Se hizo también un control con M9. Transcurrido ese periodo, se colectaron los gusanos y se lavó el pellet hasta cinco veces con M9. En el último lavado se resuspendió el pellet de nematodos en 1 mL de M9 + EDTA 1 mM + cóctel inhibidor de proteasas Sigma P8340 1X final. Se mantuvo a -80°C hasta la medición de actividad enzimática. Para ello las muestras se agitaron y se sonicaron seis veces durante 10 s en un disruptor de células Branson Sonifier (450) para obtener un homogeneizado que se centrifugó (13000 g, 5 min, 4°C). Se colectó el sobrenadante para la determinación de la actividad de catalasa (Beers & Sizer, 1952; Romanowski et al., 2012). La actividad fue medida por triplicado utilizando tres homogeneizados diferentes de gusanos (con 4000 nematodos cada uno).

Para el ensayo específico de actividad catalasa (experimento dosis respuesta) se hizo el mismo procedimiento descrito hasta ahora pero exponiendo a los nematodos a las concentraciones de 0,2; 1 y 5 mg L⁻¹. El contenido de proteínas se cuantificó según el método de Bradford, utilizando albúmina de suero bovino como estándar. La actividad catalasa fue determinada por la velocidad de desaparición de H₂O₂ mediante el monitoreo de la disminución de la absorbancia a 240 nm durante 3 min a intervalos de 15 s (Aebi, 1987).

2.7. Obtención y conservación de muestras de agua

2.7.1. Pergamino (Buenos Aires)

Se seleccionaron veinte sitios de muestreo georreferenciados repartidos entre aguas rurales subterráneas (ARSub), rurales superficiales (ARS) y urbanas superficiales (AUS) (Fig. 4.4.; Cuadro 4.1.). Las muestras superficiales fueron tomadas directamente en medio del ancho del río, de manera manual entrando en el mismo con botas de agua). La propia turbulencia del caudal del río garantizó su representatividad. En el caso de las ARSub 1 a 3, 11 y 13 se tomaron de los pozos correspondientes usando el bombeo del molino mientras que la 4 y 5 fueron tomadas de los sistemas de riego por pivotes instalados previamente. En todos los casos la colecta se hizo después de dejar correr el agua durante unos minutos. En los sitios 9 y 10 se hizo directamente desde el freatímetro, utilizando un tubo tomador de muestras. El nivel de napa freática se registró en estos puntos y fue variable entre 2-8 m. En cada punto el agua fue tomada en tres recipientes estériles: una primera parte en una botella de plástico de 0,5 L que se destinó al laboratorio analítico para medir aniones, cationes, carbonatos, bicarbonatos y sulfatos. La segunda fracción se recogió en una botella de plástico de 250 mL a la que se añadió 0,5 mL de una solución al 10% de HCl para la posterior determinación de glifosato y AMPA. La tercera fracción se colectó en un tubo *falcon* de 50 mL destinado al bioensayo con *C. elegans*. Se realizó un primer muestreo (piloto) en el mes de septiembre de 2013. Posteriormente se llevaron a cabo otros entre julio de 2014 y febrero de 2015 (para evaluar la variabilidad temporal). Los meses elegidos fueron coincidentes con las campañas de cultivo de soja y barbecho químico. El relevamiento del mes de enero de 2014 no fue llevado a cabo debido a las dificultades operativas para

acceder a la zona. Tanto la toma de muestras como su almacenamiento, transporte y conservación se realizó de acuerdo a metodología estandarizada SM 1060-C (APHA, 2012).

2.7.2. Río Tunuyán (Mendoza)

Se seleccionaron siete sitios georreferenciados, en los que se realizaron muestreos mensuales desde otoño de 2014 hasta otoño de 2015 (marzo, abril, mayo, agosto, septiembre, octubre, noviembre y diciembre). Durante los meses de invierno (junio y julio) el monitoreo se vio suspendido debido a la falta de disponibilidad de agua en los sitios Dique Tiburcio Benegas (TB) y San Martín (SM). Además, durante enero y febrero no hubo muestreos debido a dificultades operacionales. En cada uno de ellos, se tomó el agua en recipientes estériles a 0,4 m de la superficie, en el medio del río (se relevaron de manera manual utilizando un equipo de protección de traje de neopreno, guantes de goma y botas de agua). También en este caso, la turbulencia intrínseca al tipo de cauce, garantizó la representatividad de las muestras. Todos los cursos de agua fueron poco profundos (menos de 0,50 m) a excepción de los sitios Valle de Uco (VU) y TB que aun así no superaban los 2 m de profundidad. Cada colecta de agua fue dividida en cuatro alícuotas: la primera en una botella de plástico de 1 L para medir aniones, cationes y demanda química de oxígeno (DQO). La segunda fracción se colocó en una botella de plástico de 250 mL para determinación de nitratos y fosfatos. La tercera se dispuso en una botella de vidrio esmerilado estéril de 250 mL para el posterior análisis del oxígeno disuelto (OD) y la última fracción se recogió en una botella de plástico de 250 mL para la posterior cuantificación de parámetros bacteriológicos y el bioensayo con *C. elegans*. Al igual que en el caso anterior, se

realizaron todas las operaciones de acuerdo a metodología estandarizada SM 1060-C (APHA, 2012).

2.8. Determinación de parámetros fisicoquímicos *in situ*

En las campañas de muestreo se midieron en cada punto de control de acuerdo con métodos estandarizados (APHA, 2012; ASTM, 2014), los siguientes parámetros fisicoquímicos: Temperatura (T°C), oxígeno disuelto (OD), pH, conductividad eléctrica (CE) y el total de sólidos disueltos (TSD). Las determinaciones fueron hechas utilizando una sonda multiparamétrica (Horiba U-10 Model). El nivel del acuífero se obtuvo con una cinta de acero marcada con tiza o fue suministrada por los técnicos locales. El potencial de oxidación reducción (ORP) fue determinado de manera directa, usando un electrodo redox.

2.9. Determinaciones analíticas

2.9.1. Determinación de glifosato y AMPA

El análisis en las muestras de agua de Pergamino se hizo por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando un espectrómetro de masas Agilent 6460 (Abrahamsson & Sandahl, 2013). Se analizaron las aguas de los 20 puntos de muestreo en los 7 meses muestreados. El porcentaje de glifosato y AMPA se calculó considerando el número total de muestras para cada grupo de agua. Se acondicionó el pH de las aguas, llevándolas a neutralidad. Seguidamente fueron filtradas a través de discos de 0,45 µm de nylon o acetato de celulosa, verificando la ausencia de Cloro (Cl⁻)

para evitar la degradación del glifosato (agregando 100 mg L^{-1} de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Las muestras se *derivatizaron* con $0,2 \text{ mL}$ de $0,5 \text{ mM}$ FMOC (9-fluorenilmetilcloroformato) 1 mg mL^{-1} (Agilent) más $0,3 \text{ mL}$ de medio tampón borato $\text{pH}=9$ ($3,1046 \text{ g H}_3\text{BO}_3 + 3,75 \text{ g KCl} + 0,8122 \text{ g NaOH}$ llevado a 80 mL con agua de calidad miliQ y ajustado a un $\text{pH } 9$ con 1 M NaOH , volumen final de 100 mL), llevado a 4 mL de volumen final (para evitar la precipitación del FMOC, el H_2O debe ser agregada primero). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente por lo menos durante 30 min . Para recuperar el FMOC que no reaccionó se realizaron 3 extracciones con 1 mL de acetato de etilo cada vez. Luego se pasó a través de filtros de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ y se inyectó en el HPLC, según protocolo (Gosciny et al., 2012; Nedelkoska & Low, 2004; Schuster & Gratzfeld-Hüsken, 1992). Se utilizó en todo momento material plástico ya que el glifosato no *derivatizado* se adsorbe a sitios activos del vidrio.

2.9.1.1. Calibración

Se preparó una solución stock estándar ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (75:25 H_2O : MeOH) -20°C). Posteriormente se realizó una dilución de la misma, de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ en H_2O a 4°C . A partir de ella, se hicieron 6 más para proceder a la calibración para glifosato/AMPA: G1/A1: 10 ng mL^{-1} ; G2/A2: 25 ng mL^{-1} ; G3/A3: 50 ng mL^{-1} ; G4/A4: 125 ng mL^{-1} ; G5/A5: 250 ng mL^{-1} ; G6/A6: 350 ng mL^{-1} . A continuación se procedió a la *derivatización* (Agilent) para la detección de glifosato y AMPA en las muestras de agua: a $50 \mu\text{L}$ patrón (muestra) se le añadieron $100 \mu\text{L}$ de medio tampón borato y se agitó en vortex durante 30 s . Se agregaron $100 \mu\text{L}$ de FMOC y se repitió la agitación por 30 s . Se incubaron 30 min en oscuridad. Al *derivatizar* los patrones, éstos quedaron diluidos con las siguientes concentraciones para glifosato/AMPA: G1/A1: 2 ng mL^{-1} (2

ppb); G2/A2: 5 ng mL⁻¹ (2 ppb); G3/A3: 10 ng mL⁻¹ (2 ppb); G4/A4: 25 ng mL⁻¹ (2 ppb); G5/A5: 50 ng mL⁻¹ (2 ppb); G6/A6: 70 ng mL⁻¹ (2 ppb).

2.9.1.2. Determinación

La fase móvil (solventes de corrida) usada para la determinación fue (cuadro 2.2.):

- Solvente A: 0,002M KH₂PO₄ en 7% de acetonitrilo [KH₂PO₄ para preparar 1L se pesan 0,2722 g (pm 136,09)], ajustado a pH 7.
- Solvente B: acetonitrilo.

Solvente de corrida	Minuto		
	0	9	10
SC A (mL)	97	65	3
SC B (mL)	3	35	97

Cuadro 2.2. Volúmenes inyectados de fase móvil. El análisis cromatográfico total fue de 10 min. SC = solvente de corrida.

Las condiciones cromatográficas fueron:

- Columna de fase reversa: ODS (C18).
- Detector de fluorescencia: Fluorescencia λ exc 266 nm y λ emi 305 y filtro 280 nm.
- Volumen de inyección: 5 μ L.
- Flujo: 0,5 mL min⁻¹.
- Tiempo aproximado de retención de glifosato: entre 7,7 y 8,1 min.

▪ Tiempo aproximado de retención de AMPA: entre 10,4 y 10,7 min (Nedelkoska & Low, 2004; Schuster & Gratzfeld-Husgen, 1992).

▪ El límite de detección fue de 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$

2.9.2. Determinación de cationes por técnica de absorción atómica

La concentración de cationes en las muestras de agua fue determinada por Espectrofotometría de Absorción Atómica en un equipo AAnalyst 300 Perkin Elmer, a la longitud de onda propia de cada elemento; para la calibración se utilizaron patrones según la metodología analítica descrita por Perkin Elmer (1982). Se utilizaron lámparas de cátodo hueco, y la lectura fue con llama Acetileno/Aire. Los límites de detección se presentan en el cuadro 2.3.

Catión	Límite de detección (mg L^{-1})
Calcio	0,003
Magnesio	0,0005
Sodio	0,002
Potasio	0,005
Cromo	0,02
Cobre	0,01
Plomo	0,05
Zinc	0,005
Manganeso	0,001
Hierro	0,003
Cadmio	0,01

Cuadro 2.3. Límites de detección de cationes por espectrofotometría.

2.9.3. Determinación de aniones carbonato y bicarbonato

Para la determinación de aniones carbonato y bicarbonato se utilizaron los reactivos:

- Fenolftaleína 0,1%: 0,1 g de fenolftaleína fueron llevados a 100 mL de etanol.
- Naranja de metilo 0,01%: 0,01 g de naranja de metilo llevados a 100 mL con H₂O destilada.
- H₂SO₄ 0,1 N: 2,776 mL de fueron pipeteados en matraz de 1 L. Se llevaron a volumen con H₂O destilada (se controló periódicamente la concentración de esta solución).

Para la determinación de carbonatos, se tomó una alícuota de 10 mL, a la que se agregaron 6 gotas de fenolftaleína. Si la coloración se tornó rosada se consideró un positivo en CO₃²⁻ y se procedió a su titulación con 0,1 N H₂SO₄ hasta quedar incoloro. Se anotó el volumen gastado (F) y sin volver la bureta al punto 0, se prosiguió con la titulación para bicarbonatos. Si no viró al rosado al agregar la fenolftaleína, se consideró que la muestra no contenía CO₃²⁻ y se procedió directamente a la determinación de bicarbonatos. Para ello, sobre la misma alícuota anterior se agregaron un par de gotas de naranja de metilo y se tituló con el mismo ácido hasta llevar a coloración rosada. Se anotó el volumen final gastado (N) (Jackson, 1976). El resultado se calculó según se indica en el cuadro 2.4., siendo F los mL de 0,1 N H₂SO₄ gastados para virar la fenolftaleína de rosa a incoloro y N los mL de 0,1 N H₂SO₄ gastados para virar el naranja de metilo de amarillo a rosado (lectura total). Los resultados fueron expresados en meq L⁻¹.

		La muestra contiene		
Resultado de la titulación		Hidróxido	Carbonato	Bicarbonato
F=	0	0	0	N
2F>	N	0	2F	N-2F
2F>	N	2F-N	2 (N-F)	0
2F =	N	N	0	0

Cuadro 2.4. Interpretación de la titulación. Se titula CO_3 obteniendo F y sin volver a 0 se titula HCO_3 obteniendo N.

2.9.4. Determinación de cloruros

Se utilizaron los reactivos:

- K_2CrO_4 5%: 5g de K_2CrO_4 fueron llevados a 100 mL de H_2O destilada.
- NO_3Ag 0,02N: $3,3978 \pm 0,0005$ g de NO_3Ag fueron pesados en papel de aluminio y luego transferidos a un matraz de 1 L. Se disolvió con H_2O destilada llevando a volumen y se conservó en un frasco color caramelo protegido de la luz (se controló periódicamente su concentración con una solución patrón de ClNa). Para realizar el procedimiento se tomó una alícuota de 2 mL de muestra y se agregaron 3 gotas de cromato de potasio (que tomó color amarillo). Se tituló con NO_3Ag hasta obtener coloración anaranjada. Se anotó el volumen de NO_3Ag gastado de tal manera que la concentración de Cl^- se calculó como:

$$\text{Cl}^- (\text{meq L}^{-1}) = V_{\text{NO}_3\text{Ag}} * f * 10$$

Siendo V el volumen de NO_3Ag gastado en la titulación (mL) y f el factor de corrección de concentración del NO_3Ag (Jackson, 1976).

2.9.5. Determinación de sulfatos

Se utilizaron los reactivos:

- HCl.

- BaCl₂ 10%: 100 g de BaCl₂ fueron pesados y disueltos con H₂O destilada completando a volumen de 1 L.

- Heliantina 0,05%: se disolvieron 0,5 g de heliantina fina en 1 L de H₂O destilada, y se guardó en frasco caramelo.

Para realizar el procedimiento de determinación de sulfatos se tomaron 10 mL de la muestra previamente filtrada. En un vaso de precipitado se colocaron 13 gotas de solución de heliantina 0,05% y la cantidad de HCl hasta conseguir el viraje del indicador. Se calentó la solución y estando en ebullición se agregó rápidamente y con agitación 1 mL de solución al 10% de BaCl₂, durante 15 min. Después se la hizo pasar a través de papel de filtración lenta (tipo *Whatman* n 42, SSN 5893, o similar) y se lavó con agua caliente hasta reacción negativa de cloruros con NO₃Ag. Se trasladó el papel de filtro con el precipitado a un crisol de porcelana, tarado, donde se dejó secar primero sobre tela metálica amiantada y luego se quemó (evitando que arda con llama). Finalmente se calcinó al rojo moderado en ambiente oxidante durante 10-15 min (en mufla). Se enfrió con desecador, se pesó y se repitió la calcinación hasta obtener constancia de peso (más o menos 0,2 mg). Se calculó:

$$\text{SO}_4^{2-} (\text{g L}^{-1}) = P \cdot 0,414 \cdot 1000 / V$$

Siendo P el peso de BaSO₄ obtenido en g; 0,014 el factor de conversión de BaSO₄ a SO₄²⁻ y V el volumen de muestra empleado en mL (IRAM, 1998).

2.9.6. Determinación de nitratos

Para la determinación de nitratos se utilizó cloruro al 2% (20 g de H_3BO_3 fueron disueltos en 700 mL de H_2O destilada). Se agregaron 15-20 gotas de indicador verde de bromocresol-rojo de metilo y solución de 0,1 N NaOH hasta que el líquido tomó coloración gris azulada. Se llevó a volumen de un litro y se mezcló bien. Antes de realizar el procedimiento de determinación de nitratos en agua, se realizó un ensayo cualitativo para comprobar su presencia, que consistió en medir 1 mL de muestra de agua, introducirlo en un tubo de ensayo y agregar 4 mL de una solución de difenil amina disuelta en H_2SO_4 concentrado. La presencia de nitratos quedó revelada por la aparición de una coloración tanto más azul cuanto mayor cantidad de nitratos hubiera disueltos en el agua. La determinación cuantitativa se hizo según se indica: se midió una alícuota de la muestra de agua (de 200 a 250 mL) y se introdujo en un balón Kjeldhal (Schlueter, 1977). Se agregó un gramo de *aleación de Warda*, se alcalinizó el líquido con NaOH normal usando como indicador fenolftaleína al 1% y se destiló. El amoniaco destilado se recolectó en 50 mL de solución de H_3BO_3 al 2%. Finalizada la destilación, se valoró con H_2SO_4 0,1 N usando como indicador verde de bromocresol-rojo de metilo. El viraje fue del verde al azul grisáceo. Para el cálculo de la cantidad de nitratos presentes en el agua se aplicó la fórmula:

$$\text{NO}_3^- (\text{meq L}^{-1}) = V_{\text{H}_2\text{SO}_4} * N * 1000 / V$$

Siendo N la normalidad de la solución de H_2SO_4 y V el volumen de agua medido.

2.9.7. Determinación de la relación de absorción de Sodio (RAS)

Se determinó por fotometría de ionización de llama a una longitud de onda de 589 nm de acuerdo a la metodología estandarizada para el análisis de aguas SM 3500-Na⁺-B (APHA, 2012). Este método tiene una sensibilidad de 0,015 mg L⁻¹ y un rango óptimo de concentración de 0,03 a 100 mg L⁻¹ de Sodio (Na). Se nebulizaron las muestras en una llama de gas bajo condiciones controladas. La concentración en mg L⁻¹ de Na en la muestra se calculó según:

$$\text{Na (mg L}^{-1}\text{)} = (a-b) * d$$

Donde a es la concentración en mg L⁻¹ de Na en la muestra leída en el espectrofotómetro, b es el promedio de las concentraciones en mg L⁻¹ de Na en los blancos leídos en el espectrofotómetro y del factor de dilución si corresponde.

2.9.8. Determinación del fósforo total

Se hizo mediante un análisis colorimétrico usando C₆H₈O₆ de acuerdo a la metodología estándar para el análisis de aguas SM 4500P.B (APHA, 2012).

Este método se basa en la reacción en medio ácido entre el anión fosfato y el molibdato amónico en presencia de tartrato de Potasio (K) y Antimonio (Sb) para generar ácido fosfomolibdico, el cual es reducido mediante ácido ascórbico generando una coloración azul debida al Molibdeno (Mo) y susceptible de determinación colorimétrica. La cantidad de fósforo presente se calcula a partir de las lecturas de transmitancia de patrones y muestras, construyendo una curva de calibrado.

2.9.9. Determinación de fosfato soluble

Los niveles de fosfato soluble (PO_4^{3-}) se determinaron por el método del ácido vanadomolibdofosfórico de acuerdo a la metodología estandarizada para el análisis de aguas SM 4500P.C (APHA, 2012). En una disolución diluida de ortofosfatos, el molibdato de amonio reacciona en condiciones ácidas con el vanadato para formar un heteropoliácido, ácido vanadomolibdofosfórico. En presencia del vanadio se forma ácido vanadomolibdofosfórico de color amarillo. La absorbancia fue medida a longitud de onda de 420 nm. La intensidad del color amarillo fue directamente proporcional a la concentración de fosfato.

2.9.10. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Para ello se empleó el método colorimétrico de reflujo cerrado, de acuerdo a la metodología estandarizada para el análisis de aguas SM 5220-D (APHA, 2012). La reacción se llevó a cabo a 150°C durante 2 h y se determinó mediante un espectrofotómetro Hach a 420 nm.

2.9.11. Análisis bacteriológicos

Las bacterias aerobias mesófilas (BAM) se cuantificaron de acuerdo con el método estándar de recuento en placa (SM 9215-B) (APHA, 2012). Los coliformes termotolerantes totales (CTT) y coliformes totales (CT) se determinaron por la técnica de fermentación en tubos múltiples (SM 9221-B y E) (APHA, 2012).

2.10. Diagrama de Piper

Con el fin de visualizar el patrón hidrogeoquímico de las aguas superficiales y subterráneas, se construyó un diagrama triangular de Piper con los iones mayoritarios. Este es un método de identificación de la composición de iones en aguas. El diagrama se construyó usando el software libre de la Universidad de Avignon (Francia) *Diagrama*, versión 5.4.; para ello, los iones y cationes mayoritarios se representaron en los dos triángulos de base como porcentajes de miliequivalentes y además fueron proyectados en el rombo superior definiendo así las características de iones totales (Chadha, 1999; Piper, 1944).

2.11. Índice de categorización de efectos tóxicos

Para caracterizar la magnitud del efecto tóxico de las aguas sobre *C. elegans*, se construyó una escala de categorías de acuerdo a los valores de crecimiento relativo (respecto al control con M9) del nematodo obtenidos en el bioensayo (Höss et al., 2009) que van desde 0 a 1: 0,90-1 (*no tóxico*), 0,89 - 0,75 (*ligeramente tóxico*), 0,74 - 0,50 (*moderadamente tóxico*) y 0,49 - 0 (*muy tóxico*). Se calculó el porcentaje de cada una de las categorías para cada punto de control.

2.12. Índice de Calidad de Aguas (ICA)

Con el propósito de integrar todos los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos, se calculó un ICA para cada cuenca analizada incorporando aquellos

cuya concentración máxima admisible está regulada por la legislación ambiental vigente. El cálculo se hizo de acuerdo a la ecuación descrita en el Informe de Indicadores de Sostenibilidad Ambiental de Canadá (CCME, 1999), a partir de la suma de los cuadrados de tres factores F_1 , F_2 y F_3 .

$$\text{CCME ICA} = 100 - [(F_1 + F_2 + F_3)^{1/2} / 1,732]$$

donde F_1 , es el alcance y representa el porcentaje de variables que no cumple con la normativa local vigente (las variables fallidas) al menos una vez durante el período de tiempo considerado, en relación al número total de variables medidas:

$$F_1 = (\text{Número de variables fallidas} / \text{Número total de variables}) * 100$$

F_2 es la frecuencia y representa el porcentaje de mediciones individuales que no cumplen con la normativa local vigente (mediciones fallidas):

$$F_2 = (\text{Número de mediciones fallidas} / \text{Número total de mediciones}) * 100$$

F_3 es la amplitud y representa cuánto se aparta el valor obtenido de las mediciones fallidas que no cumplen con el valor límite, establecido por la normativa local vigente:

$$F_3 = (\text{nse} / \text{nse} + 1)$$

donde nse es la suma de dispersiones e indica la cantidad global por la cual una medición individual está fuera de cumplimiento. Si $\text{nse} > 0$, entonces: $0 < \text{nse} / (\text{nse} + 1)$.

Se calcula sumando todas las dispersiones y dividiendo por el número total de mediciones (tanto los parámetros que cumplen los límites como los que no):

$$nse = [\sum_{i=1}^n \text{dispersión}_i / \text{número de mediciones}]$$

La dispersión resulta del número de veces que una concentración individual es mayor que los límites y se calcula como:

$$\text{dispersión}_i = (\text{valor de mediciones fallidas}_i / \text{límite}_j) - 1$$

O para los casos en los cuales el valor de la medición no está por debajo del límite:

$$\text{dispersión}_i = (\text{límite}_j / \text{valor de mediciones fallidas}_i) - 1$$

Los valores del índice van desde 0 a 100 (siendo 100 la mejor puntuación posible de calidad de aguas) y presenta las categorías: *excelente* (95-100); *buena* (80-94); *media* (65-79); *mala* (45-64) y *muy mala* (0-44) (Statistics Canada, 2014).

Para desarrollar el índice de la cuenca del río Pergamino (capítulo 4), se seleccionaron: T°C, pH, CE, Cl⁻, Cu²⁺, NO₃⁻, SO₄²⁻, Zn²⁺; Cr, Cd²⁺ y Fe²⁺. Los límites máximos permisibles fueron proporcionados desde distintos reglamentos, teniendo en cuenta los valores más restrictivos. Para Cu²⁺, Cr y Cd²⁺ se fijaron los valores límites de acuerdo al Decreto 831/93 para protección de la vida acuática en agua dulce, de la Ley N° 24.051 (1991) de residuos peligrosos. En el caso de Zn²⁺, pH, Cl⁻ y SO₄²⁻, se tuvieron en cuenta los valores límite de la Resolución 42/06 y para Fe²⁺ se usó la

Resolución N° 336/2003 para la protección de la vida acuática establecida por la Mesa de la Autoridad del Agua de la provincia de Buenos Aires (Ley N° 12257, Código de agua. Ministerio de Agroindustria, República Argentina). Para la T°C se usaron los límites establecidos por la Autoridad de la Cuenca Matanza-Riachuelo (ACUMAR) para la protección de la vida acuática (Resolución N° 3/2009 ACUMAR. Ley N° 26.168. Secretaría de ambiente y Desarrollo Sustentable, República Argentina), el límite de la CE para el uso del agua de riego se fijó en menos de 1500 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (de acuerdo con la clasificación de aguas subterráneas con fines de riego) (UCCC, 1974). En el caso de la concentración de NO_3^- , se utilizó el límite para agua potable establecido por el Código Alimentario Argentino, fijado por debajo de 45 mg L^{-1} (Capítulo XII. Decreto N° 2126/07 de la Ley N° 18.284. Código Alimentario Argentino) (ver apéndice 3).

Para construir el ICA del río Tunuyán (capítulo 5) se seleccionaron los siguientes parámetros: T°C, caudal, pH, CE, RAS, Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , PO_4^{3-} , P, DQO, OD, BAM, CT y CTT. Los mismos fueron determinados de acuerdo con la normativa local vigente que proporcionan los límites máximos permisibles para los vertidos directos e indirectos en los cursos de agua con fines de riego (DGI, 1996).

2.13. Análisis estadístico

Los datos del test de toxicidad crónica con *C. elegans* (capítulo 3), el bioensayo piloto (capítulo 4) así como los resultados del análisis cuantitativo por RT-PCR de genes (capítulo 3), fueron analizados con el programa Graph Pad Prism® versión 6.01 para Windows (Prism, 1994). En el caso del test de toxicidad, los resultados se graficaron en función de la concentración de glifosato comercial y se calculó la concentración efectiva media (CE50) aplicando el modelo sigmoidal. Se utilizó el

análisis de la varianza seguido de la prueba de Dunnett para comparar los resultados con el control con M9 (con un nivel de significación de 0,05) y se estudió la correlación entre las variables con el análisis de Pearson (con un intervalo de confianza del 95%).

El análisis de resultados obtenidos en la cuenca de Pergamino (capítulo 4) y río Tunuyán (capítulo 5) se hizo con el programa de análisis estadístico R (Core Team, 2016). En ambos casos se realizó previamente la prueba de Shapiro Wilks para probar la normalidad de las variables. Debido al comportamiento no normal de la mayoría de los parámetros, se decidió utilizar métodos de análisis de la varianza que no tuvieran a la normalidad de los datos como supuesto. Para los datos de parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos (en el caso de las muestras del río Tunuyán), la diferencia entre la media y la mediana se utilizó para evaluar el valor más frecuente de la dispersión promedio entre los puntos de muestreo (Antonopoulos et al., 2001; Parmar & Bhardwaj, 2014). Adicionalmente, se realizaron análisis de regresión lineales para ver la relación entre el crecimiento relativo de *C. elegans* y los datos del ICA. Para ello, cada valor del ICA se correlacionó con el conjunto de datos mensuales de crecimiento relativo de *C. elegans*.

En el caso de los parámetros fisicoquímicos de la cuenca de Pergamino se realizó un análisis univariado de la varianza (ANAVA) no paramétrico (Kruskal-Wallis) para comparar las muestras de agua discriminando por origen y por estaciones. El nivel de significación elegido fue del 5%. Para representar la dispersión de los grupos de datos, así como los valores atípicos, se utilizaron boxplots. En este análisis, se muestra posición, dispersión, simetría o asimetría y observaciones atípicas del conjunto de datos. En el caso del conjunto de datos de SO_4^{2-} , se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney también con un nivel de significación del 5% (Conover, 1980). Esta prueba basada en el rango, no hacen suposiciones acerca de la distribución de las variables y mantienen una eficiencia relativa asintótica razonable. En el caso de Zn^{2+} , TSD,

glifosato y AMPA se realizó una prueba de la mediana; es un caso especial de *chi-cuadrado* de Pearson (un análisis no paramétrico) utilizado para probar si dos grupos difieren en su valor medio. Este análisis determina si los datos proceden de poblaciones con la misma mediana con el fin de compararlos. Para glifosato y AMPA las comparaciones se hicieron entre los grupos de agua y por estaciones. Se estudió también la correlación entre el crecimiento y los parámetros fisicoquímicos con los análisis de Pearson y Spearman con un nivel de significación del 5%.

Para el análisis de los datos de las variables estudiadas en la cuenca del río Tunuyán se hicieron comparaciones no paramétricas: pruebas de Mann-Whitney y de Friedman (bloqueando por mes y considerando a cada sitio de medición como un tratamiento) con un nivel de significación del 5% (Conover, 1980). Posteriormente se hicieron comparaciones múltiples entre grupos para aquellas pruebas que resultaron significativas. Se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (ACP) para relacionar los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos con el crecimiento relativo de *C. elegans*. El ACP es una técnica útil para identificar grupos con propiedades similares o diferentes dentro de un gran número de datos que se caracteriza por muchas variables y unidades experimentales (Li et al., 2007; Llario et al., 2006; Ouyang, 2005; Simeonov et al., 2002). El propósito del ACP es el de reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos. El método se basa en proyecciones de muestras iniciales multivariadas dispuestas en unos nuevos ejes de coordenadas (componentes principales) que son generados considerando la varianza máxima de las muestras y que son mutuamente ortogonales. El primer componente principal (CP1) de cada observación multivariada se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$CP1 = \sum_i W_i * \log(1 + X_i)$$

donde cada X_i es cada una de las variables (crecimiento relativo del nematodo, caudal, Cl, Na^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , SO_4^{2-} , BAM, CT, CTT) y W_i el coeficiente de la combinación lineal que genera el CP1 correspondiente a cada observación multivariada. El CP1 es un *componente de forma* que contrasta la variable crecimiento relativo del nematodo contra las variables fisicoquímicas y bacteriológicas de acuerdo con:

$$\text{CP1} = W_0 \cdot \text{crecimiento} - \sum_i W_i * \log(1 + X_i); W_0, W_i > 0$$

También se realizaron 3 modelos de regresión lineal con objeto de encontrar el mejor modelo de correlación de los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos con el crecimiento relativo del nematodo como variable dependiente. De estos, el llamado modelo completo utiliza todas las variables disponibles como regresoras; el reducido sólo incluyó las variables presentes en los cálculos del ICA y el óptimo consideró las mejores regresoras. Todos ellos siguieron la expresión lineal:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \dots + \beta_p X_{ip} + \varepsilon_i$$

donde y_i es la variable respuesta (crecimiento relativo del nematodo) correspondiente para cada i , X_{ip} es la p -ésima variable regresora (datos fisicoquímicos y bacteriológicos) para cada i . β_p es un parámetro estadístico y ε_i es una variable aleatoria normal (media 0 y varianza residual σ^2). La estimación de los parámetros se realizó por el método de mínimos cuadrados. El modelo estimado fue usado para producir predicciones para la variable respuesta (crecimiento relativo) teniendo en cuenta los valores conocidos de las variables regresoras (parámetros fisicoquímicos y

bacteriológicos). Para cada modelo, se calculó el R^2 y R^2 -ajustado, siendo el R^2 la proporción de variabilidad en la variable respuesta que puede ser explicada por el modelo de regresión lineal con las variables regresoras y el R^2 -ajustado la proporción de variabilidad en la variable respuesta que puede ser explicada por el modelo de regresión lineal con las variables regresoras pero penalizado por el número de parámetros usados en el modelo (Drapper & Smith, 1981). El modelo que presentó el R^2 -ajustado más alto fue el considerado como óptimo.

Tanto para el ACP como para el modelo lineal, se aplicó a los datos una transformación logarítmica $[\log (1 + X)]$, con el objetivo de tener distribuciones simétricas de variables fisicoquímicas y biológicas (Conover, 1980; Drapper & Smith, 1981; Peña, 2002).

CAPÍTULO 3.

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA
DE *C. elegans* TRAS LA
EXPOSICIÓN A GLIFOSATO**

Capítulo 3. Estudio de la respuesta de *C. elegans* tras la exposición a glifosato

3.1. Introducción

Con el fin de optimizar un bioensayo reproducible y de fácil ejecución que permita analizar la toxicidad de una sustancia a gran escala, se comenzó por estudiar tres parámetros de respuesta del ciclo de vida del nematodo *C. elegans*. En ese sentido, para establecer el protocolo, se analizaron la variación del crecimiento corporal, la fertilidad y la reproducción al ser expuestos a concentraciones crecientes del glifosato comercial; determinando la relación dosis-respuesta.

Se optó por trabajar con una formulación comercial del herbicida, ya que los principios activos están acompañados de otras sustancias químicas como surfactantes que pueden influir en la toxicidad final. La mayor parte de la literatura actual sobre la toxicidad de este herbicida aborda un enfoque desde la toxicología clásica, que centra su criterio en la valoración de la viabilidad, la reproducción y la fertilidad de diferentes organismos, existiendo poca información sobre el mecanismo molecular intracelular en organismos no blanco. Anbalagan et al. (2013) estudiaron la respuesta de *C. elegans* en extractos orgánicos de suelos agronómicos. Se utilizaron cepas transgénicas que portan el gen *gfp* reportero, permitiendo la correlación entre los datos de expresión visualizados con él y las concentraciones de metales presentes en el suelo.

El estrés oxidativo es un estado tóxico causado por un desequilibrio entre la producción y la eliminación de ERO. Estas moléculas incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como

subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, durante condiciones de estrés ambiental sus niveles pueden aumentar en gran manera, lo cual puede resultar en daños significativos en el ADN, ARN, proteínas y lípidos. De hecho, se cree que esa puede ser una de las principales causas del envejecimiento. Cuando un organismo se encuentra en un entorno desfavorable, sometido a condiciones de estrés oxidativo, se activarán mecanismos moleculares que le permiten a las células del mismo intentar reparar ese daño sufrido y en caso de no ser posible, accionar la cascada de muerte celular programada. La activación específica de estos mecanismos se relaciona con el nivel de expresión de ARNm de diferentes enzimas clave.

Caenorhabditis elegans posee varios sistemas enzimáticos capaces de detoxificar ERO y regular el balance redox de la célula (Fig. 3.1.). Uno de estos sistemas está encargado de detoxificar el anión superóxido, el cual es primero transformado en un peróxido por la enzima superóxido dismutasa, y este producto es luego transformado en agua por la enzima catalasa y/o diferentes peroxirredoxinas. Existen dos grandes sistemas que actúan en conjunto con la superóxido dismutasa y la catalasa para detoxificar ERO: el sistema tiorredoxina y el sistema glutatión. El sistema tiorredoxina se basa principalmente en la proteína tiorredoxina (TRX) y la enzima tiorredoxina reductasa (TRXR). El sistema glutatión incluye al glutatión (GSH), la glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasas (GPXs), la glutarredoxina (GRX) y glutatión-S-transferasas (GSTs). En este sistema, el glutatión tiene una forma activa (estado reducido) capaz de reducir diferentes proteínas blanco (entre las que se encuentran GPX, GRX, GST). Luego la glutatión reductasa es la encargada de reducir al glutatión oxidado (GSSG) nuevamente a su forma activa (GSH) (Fig 3.1.).

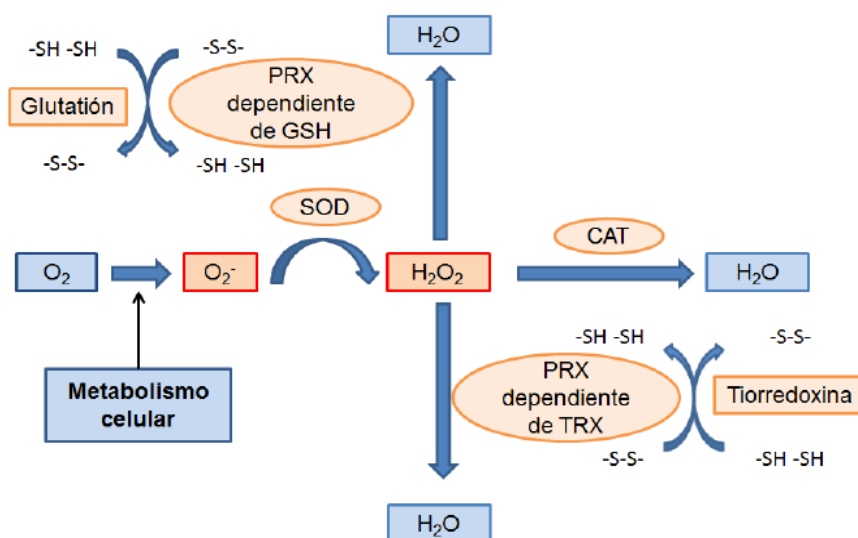


Figura 3.1. Mecanismos de protección del estrés oxidativo. El ion superóxido, generado durante la respiración aeróbica, es convertido en H_2O_2 por la superóxido dismutasa. El peróxido es luego detoxificado a través de catalasas, peroxirredoxinas dependientes de tiorredoxina o peroxirredoxinas dependientes de glutatión. El sistema glutatión y el sistema tiorredoxina actúan en conjunto para detoxificar ERO. Fuente: Romanowski et al., 2012.

El hábitat natural de *C. elegans* es el suelo, donde está expuesto a diferentes agentes estresantes, tales como estrés abiótico, oxidativo, térmico (ya sea por frío o calor), radiación UV, entre otros. Si combinamos este hecho con las características descritas en la introducción general, podemos decir que por esa razón, es un excelente modelo para estudiar interacciones con agentes estresantes ambientales mediado por la respuesta al estrés oxidativo (Cabreiro, 2011; Gems & Doonan, 2009; Van Raamsdonk & Hekimi, 2010).

3.2. Objetivos

El objetivo general en este capítulo es la combinación de los específicos que se detallan a continuación:

1. Estudio del efecto del formulado comercial de glifosato (Roundup® Ultra) sobre el crecimiento, fertilidad y reproducción de *C. elegans*.

2. Estudio de la generación de ERO por exposición a glifosato.
3. Estudio de la inducción de la respuesta a estrés oxidativo, tras la exposición al glifosato comercial.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Efecto crónico del glifosato sobre el ciclo de vida del nematodo *C. elegans*

En la Fig. 3.2. se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas para los parámetros crecimiento, reproducción y fertilidad, en función de la concentración de glifosato y el ajuste sigmoideal realizado sobre cada una de ellas.

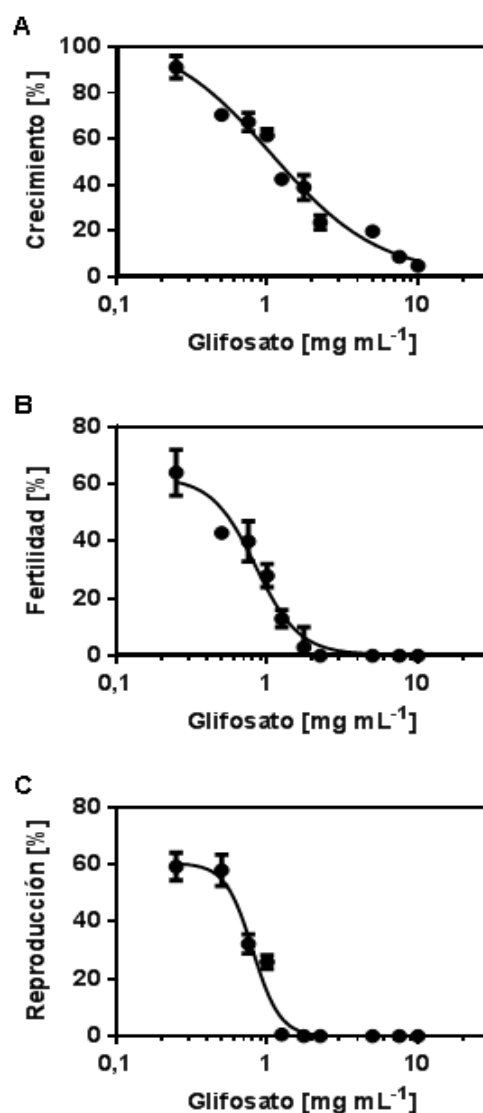


Figura 3.2. Test de toxicidad crónica con *C. elegans*. Crecimiento (A), fertilidad (B) y reproducción (C) de nematodos sincronizados en estadio L1 expuestos a concentraciones crecientes de glifosato en medio tampón M9 con *E. coli*, durante 96 h a 20°C. Cada ensayo fue hecho con 10 nematodos por cuádruplicado. Los valores de porcentajes de cada respuesta relativizados a su respectivo control con M9, se representan frente a las diferentes concentraciones del plaguicida. Los gráficos muestran las curvas sigmoideas ajustadas a los datos de respuesta, usando el software GraphPad Prism 6.

En el cuadro 3.1. se muestran los parámetros de las curvas dosis-respuesta. Fue calculada la CE50 para el crecimiento, la reproducción y la fertilidad del nematodo.

Parámetro	Crecimiento	Reproducción	Fertilidad
CE50 [mg mL ⁻¹]	1,058	0,827	0,850
Intervalo de confianza 95%	0,8091 a 1,384	0,7737 a 0,8836	0,7496 a 0,9632
R ²	0,9653	0,9630	0,9435

Cuadro 3.1. Valores de CE50 del formulado comercial de glifosato para *C. elegans*.

Los resultados mostraron que tanto el crecimiento de *C. elegans* como la reproducción y la fertilidad fueron inhibidos por el glifosato, siendo estos dos últimos parámetros ligeramente más sensibles que el tamaño del cuerpo.

Las concentraciones ensayadas en esta tesis, son mayores a las encontradas en el análisis de muestras ambientales de agua realizado en el capítulo 4 de esta tesis (ver cuadro 4.2.); que no superan los límites establecidos para campo: 0, 9 mg L⁻¹ como límite para la presencia de glifosato en aguas según la EPA; 0,28 mg L⁻¹ según la ley Argentina de residuos peligrosos (Ley 24051/92) y 0,1 µg L⁻¹ según la Unión Europea. Sin embargo, es importante evaluar estos efectos ya que se dan casos de exposición directa a concentraciones altas ya sea por derrames puntuales o en tareas de manipulación del herbicida. Los resultados aquí obtenidos son similares a los encontrados previamente por Cole et al. (2004), uno de los primeros grupos que propuso a *C. elegans* como modelo. En este estudio, se usó el comportamiento (mediante un seguimiento computerizado del movimiento de cada individuo), asumiendo que las modificaciones en este parámetro del nematodo estaban relacionadas con cambios neuronales inducidos por diferentes plaguicidas organofosforados. Se calcularon los valores de EC50 para cada producto químico en el nematodo y se compararon con los de ratas y ratones, mostrando que los órdenes de magnitud en el caso del glifosato estaban significativamente correlacionados a un nivel de significancia de 0,01 para ratas

y de 0,05 para ratones, utilizando el coeficiente Rank de Spearman. Esto estaría confirmando que *C. elegans* es sensible a formulaciones comerciales de glifosato y que la CE50 es comparable a la de modelos mamíferos. Si se contrastan los resultados de este trabajo con los de otros donde se han llevado a cabo ensayos *in vitro* de exposición de *C. elegans* a glifosato, en el caso de Ruan et al. (2009), encontraron también una disminución del crecimiento corporal pero en una exposición aguda y a concentración menor ($0,007 \text{ mg mL}^{-1}$). Otros autores señalaron efectos (neurodegenerativos) a concentraciones subletales del herbicida (Negga et al., 2012) o reportaron efectos en diversos parámetros del nematodo (como la reproducción o sobrevivencia) para la mezcla de dos pesticidas (Negga et al., 2011; Viñuela et al., 2010). En este trabajo por primera vez se dan las curvas dosis-respuesta mostradas, y las CE50 correspondientes para el herbicida glifosato.

Con respecto a otros organismos, García Torres et al. (2014) evaluaron la exposición al glifosato de dos especies de anélidos (se evaluaron los parámetros mortalidad, biomasa, fecundidad y viabilidad del adulto) pero los efectos adversos fueron observados a concentraciones muy superiores a las recomendadas para aplicar en campo que en general van desde 1 hasta 3 mg Kg^{-1} , variando según el volumen de cosecha. Ellos observaron efectos adversos, tanto en la fecundidad como en la viabilidad de los huevos, a concentraciones de glifosato muy altas, de 5000 mg Kg^{-1} ; así que no se establecieron como modelos lo suficientemente sensibles.

3.3.2. Generación de ERO inducida por glifosato

Una vez visto que el glifosato comercial produjo una disminución en el crecimiento, la fertilidad y la reproducción de *C. elegans*, se investigó la modificación

del equilibrio redox en el nematodo como un posible mecanismo de la toxicidad de este agroquímico (Fig. 3.3.).

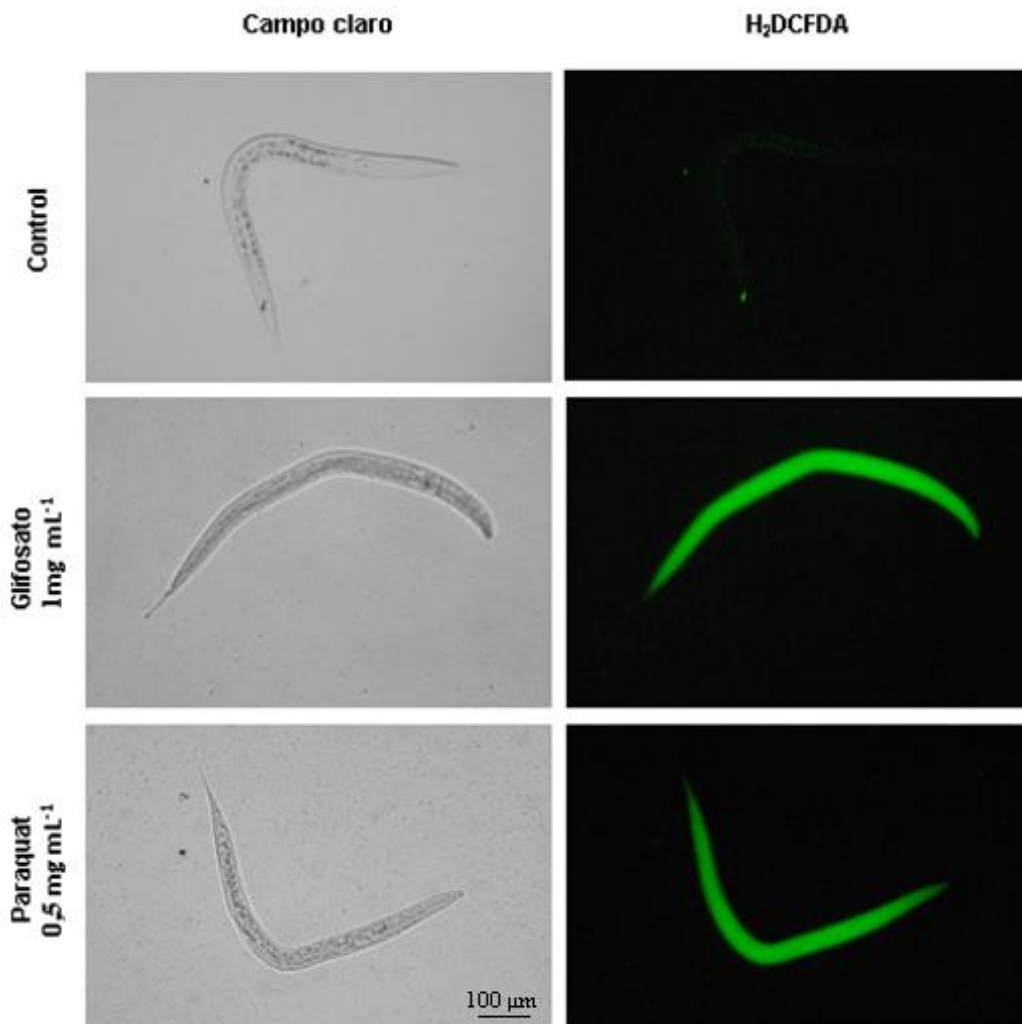


Figura 3.3. Producción de ERO en nematodos expuestos a glifosato. Los nematodos en estadio L4 fueron tratados con glifosato (1 mg mL^{-1}), paraquat ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) o incubados con M9 (control), durante 16 h a 20°C . Posteriormente fueron recolectados, tratados con H_2DCFDA y montados para su visualización en el microscopio. Las imágenes son representativas de 50 nematodos visualizados durante el ensayo.

Los resultados muestran una apreciación cualitativa de que la exposición a glifosato incrementó la producción de ERO al mismo nivel que el paraquat, cuando comparamos con el control. El estrés oxidativo se desarrolla cuando hay un desequilibrio entre los prooxidantes y la relación de anti-oxidantes, dando lugar a la

generación de ERO. Los contaminantes ambientales, tales como herbicidas, metales pesados e insecticidas, modulan los sistemas de defensa antioxidante y pueden causar daño oxidativo en los organismos por la producción de ERO (Liu et al., 2006; Monteiro et al., 2006). En *C. elegans* se ha estudiado la inducción de la generación de ERO tras la exposición a diferentes plaguicidas (Zong et al., 2014). Varios autores reportaron producción de ERO tras el tratamiento con los insecticidas clorpirifós (Jadiya & Nazir, 2012) y monocrotofos (Leelaja & Rajini, 2013). Se ha encontrado que la generación de ERO a partir de la exposición a plaguicidas organofosforados podría ocasionar lesiones en el ADN de los peces expuestos (Cavalcante et al., 2008; Ghilherme et al., 2012); estos daños son producidos por la inhibición tras la exposición de las enzimas implicadas en su reparación (Saleha et al., 2001). Nwani et al. (2013) también reportaron resultados similares en la especie *Channa punctatus*, demostrando que exposiciones subletales del herbicida glifosato inducen daño genotóxico. Peixoto (2005), estudió el impacto del Roundup® y del glifosato puro en la fosforilación oxidativa mitocondrial de ratas, encontrando que el principio activo en sí mismo no mostró ningún efecto relevante sobre la bioenergética de esta organela, no así los compuestos formulados, con los que sí hubo toxicidad a nivel energético. Estas diferencias podrían ser atribuidas a un efecto conjunto del herbicida puro y el formulado. Esta sinergia también ha sido estudiada y reportada en procesos de división celular (Marc et al., 2002). La aplicación de un enfoque más sensible, con una exposición crónica, tal y como se lleva a cabo en este trabajo, es esencial para la completa evaluación del riesgo ambiental real de los herbicidas (incluyendo así información del efecto sobre los seres vivos).

3.3.3. Respuesta específica al estrés oxidativo inducida por una formulación comercial de glifosato

Puesto que se observó la producción de ERO, se estudió si la expresión de genes representativos de respuesta a estrés sufre modificaciones debido al tratamiento con glifosato comercial.

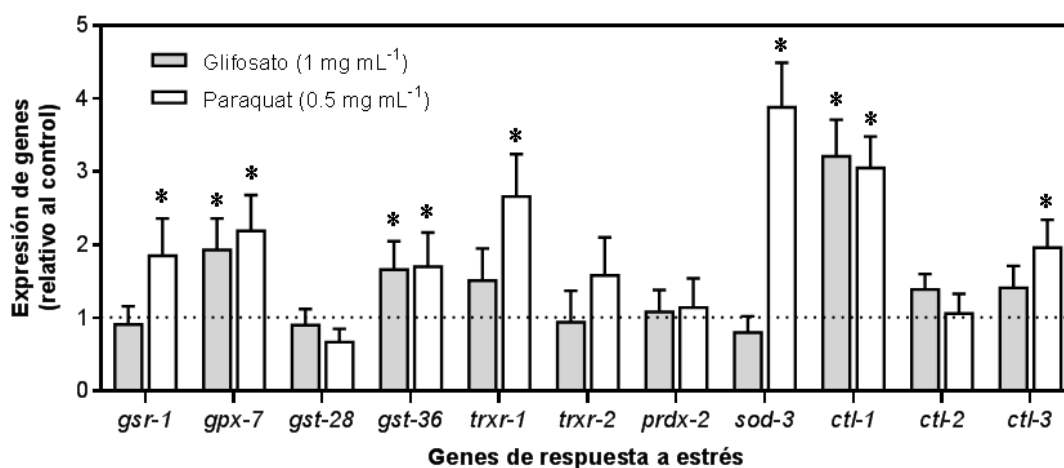


Figura 3.4. Análisis cuantitativo por RT-PCR de genes involucrados en la respuesta a estrés oxidativo en nematodos expuestos a glifosato. Nematodos en estadio L4 fueron tratados con glifosato (1 mg mL⁻¹), paraquat (0,5 mg mL⁻¹) o incubados en M9 (control) durante 16 h a 20°C. Estos nematodos fueron recuperados y se midió los niveles de mRNA de cada uno por RT-PCR. El nivel de expresión de cada producto de PCR fue relativizado al gen *housekeeping*, *cdc-42* y al control con M9 (línea punteada). Los valores representan las medias \pm SD de 3 réplicas (n=4000 L1 cada uno) y es representativo de 3 ensayos independientes. *diferencias significativas según ANAVA ($p < 0.05$) y test de Dunnet $p < 0,0001$.

Como muestra la Fig. 3.4., hubo un aumento muy marcado al poner a prueba la expresión de algunos genes de respuesta a estrés oxidativo. En el caso de *sod-3*, tras el tratamiento con paraquat (control positivo de inducción) la respuesta fue significativa. Sin embargo no fue así respecto al glifosato, con el que si bien hubo un cierto aumento,

la mayoría de los genes no cambiaron respecto al control excepto para el caso de *gpx-7*, *gst-36* y *ctl-1*. Ya que en este último fue muy marcado, se decidió investigarlo en más detalle. Para ello, se hizo un análisis específico de su actividad con un experimento dosis respuesta, viendo la expresión de los 3 genes que en *C. elegans* codifican para la catalasa (*ctl-1*, *ctl-2* y *ctl-3*) tras la exposición a diferentes concentraciones de glifosato comercial (Fig. 3.5.).

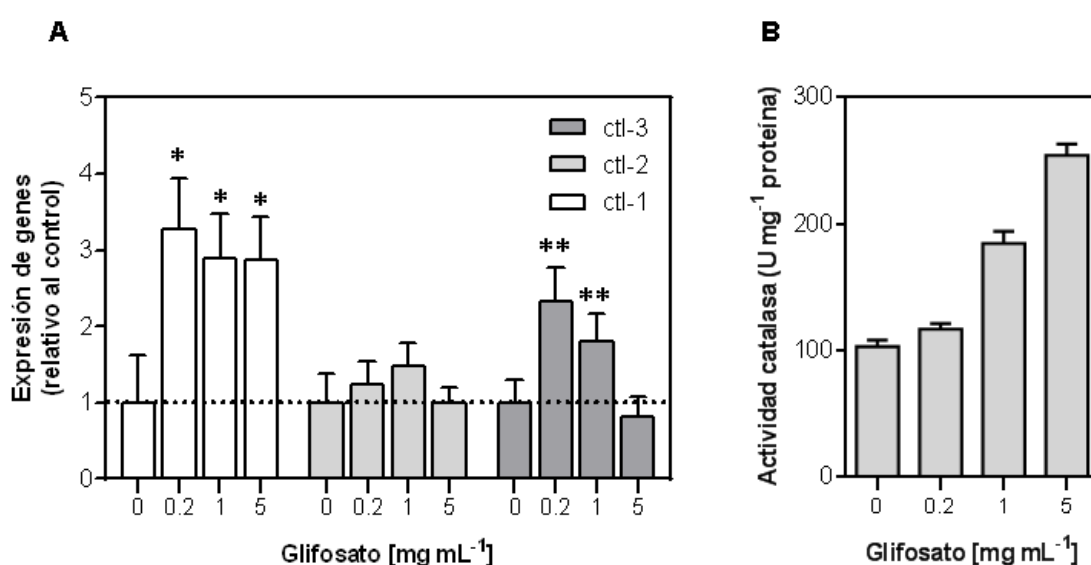


Figura 3.5. Análisis cuantitativo por RT-PCR de genes de catalasa (A) y actividad específica de la catalasa (B) en nematodos expuestos a concentraciones crecientes de glifosato. Se trataron nematodos en estadio L4 con las diferentes concentraciones de la formulación comercial de glifosato durante 16 h a 20°C. Los niveles de expresión de cada producto de PCR fueron relativizados al gen *housekeeping*, *cdc-42*, y al control con M9 (línea punteada). Los valores representan las medias \pm SD de 3 réplicas ($n=4000$ L1 cada uno) y es representativo de 3 ensayos independientes. * diferencias significativas según ANAVA ($p<0.05$) y test de Dunnet * $p<0.0001$; ** $p=0.0023$.

A una concentración de 0,2 mg mL⁻¹ de glifosato comercial, los genes para catalasa *ctl-1* y *ctl-3* fueron inducidos hasta 3 y 2 veces sobre el control, mientras que para *ctl-2* la respuesta no fue significativa (Fig. 3.5.). La forma más activa en *C. elegans* es la *ctl-2*, de localización peroxisomal, que representa un 80% de la actividad total de la catalasa en el organismo. El resto corresponde a la *ctl-1*, citosólica y a la *ctl-3*,

posiblemente de localización mitocondrial (Petriv & Rachubinski, 2004). Puede ser que el patrón de expresión de las distintas isoformas de la enzima esté relacionado con su localización subcelular particular, de tal manera que puede estar dando información sobre a qué organela esté afectando el glifosato. Por ejemplo, el hecho de que *ctl-2* no haya sido inducido, podría deberse a que la exposición al agroquímico no interviene con el metabolismo normal del peroxisoma mientras que si lo hace a nivel del metabolismo mitocondrial y citosólico (de ahí el marcado incremento en *ctl-1* y *ctl-3*). Esto coincide con los resultados encontrados por otros autores, que también reportaron una falta de inducción de *ctl-2* tras el tratamiento a glifosato (Anbalagan et al., 2013) y también con el agroquímico clorpirifós (Roh & Choi, 2008). Modesto y Martínez (2010) encontraron, en los peces tropicales *Prochilodus lineatus*, que los niveles de actividad catalasa así como de superóxido dismutasa disminuían tras la exposición a Roundup®.

La modificación en la expresión génica como respuesta a estrés ambiental, se utiliza cada vez más en ecotoxicología ya que ofrece valores de alta sensibilidad y pueden ser muy útiles para el diagnóstico temprano de la contaminación ambiental (Lee & Choi, 2006; Poynton et al., 2007; Roh et al., 2006, 2007; Snell et al., 2003). De hecho, los genes que codifican para las tres catalasas pueden resultar posibles biomarcadores a incluir en un futuro diseño del bioensayo con *C. elegans*, para la obtención de una respuesta, también a nivel molecular, del impacto de diferentes tóxicos.

3.4. Conclusiones

Los resultados demostraron que tanto el crecimiento de *C. elegans* como la reproducción y la fertilidad fueron inhibidos por el glifosato comercial de manera

concentración-dependiente, calibrando y validando de esta manera el bioensayo con *C. elegans*. Se reveló también que esto puede estar relacionado con la generación de estrés oxidativo que resulta en un incremento en la expresión de genes de respuesta antioxidante.

La reproducción y la fertilidad fueron ligeramente más sensibles a la exposición al agroquímico que el tamaño del cuerpo. Para la longitud corporal, la CE50 fue de 1,058 mg mL⁻¹ de glifosato y 0,827 mg mL⁻¹ y 0,850 mg mL⁻¹ para la reproducción y la fertilidad, respectivamente. El estudio de la respuesta antioxidante causada por la exposición al herbicida comercial sugiere la existencia de un desbalance redox por acumulación de ERO. Se observó un aumento significativo en la expresión de genes de catalasa y también su actividad tras el tratamiento con glifosato. Se han identificado los posibles genes de respuesta a estrés oxidativo tras la exposición, que puedan ser factibles en un futuro para la evaluación de los cambios moleculares en muestras ambientales de agua potencialmente contaminadas con este producto. De los genes analizados, los que codifican las tres catalasas y las dos tiorredoxinas resultaron los biomarcadores más prometedores.

CAPÍTULO 4.

CARACTERIZACIÓN DE

AGUAS DE LA REGIÓN

PAMPEANA. USO DE *C. elegans*

PARA LA EVALUACIÓN DE LA

TOXICIDAD

Capítulo 4. Caracterización de aguas de la región Pampeana. Uso de *C. elegans* para la evaluación de la toxicidad

4.1. Introducción

4.1.1. Selección de la zona de estudio

La región pampeana (30-40 S, 55-65 W), una de las más grandes praderas del mundo (Bilenca & Miñarro, 2004) cuenta con una gran extensión de tierra de alrededor de 52000000 ha donde predomina un clima templado (Fig. 4.1.). La temperatura media varía entre 14 °C al sur y 17 °C en el norte. El promedio de precipitaciones anuales, la mayoría concentradas en primavera y verano, va desde 600 mm en el suroeste a 1000 mm en el noroeste (Viglizzo et al., 1995). Los regímenes de estas precipitaciones varían a través del tiempo y el espacio, produciéndose episodios cíclicos de sequías e inundaciones que afectan tanto a cultivos como a la producción de ganado (Viglizzo & Frank, 2006). Durante las últimas cuatro décadas, ha habido una notable expansión de los cultivos hacia el oeste en respuesta a un aumento persistente de precipitaciones (Frank & Viglizzo, 2012; Viglizzo et al., 2011).

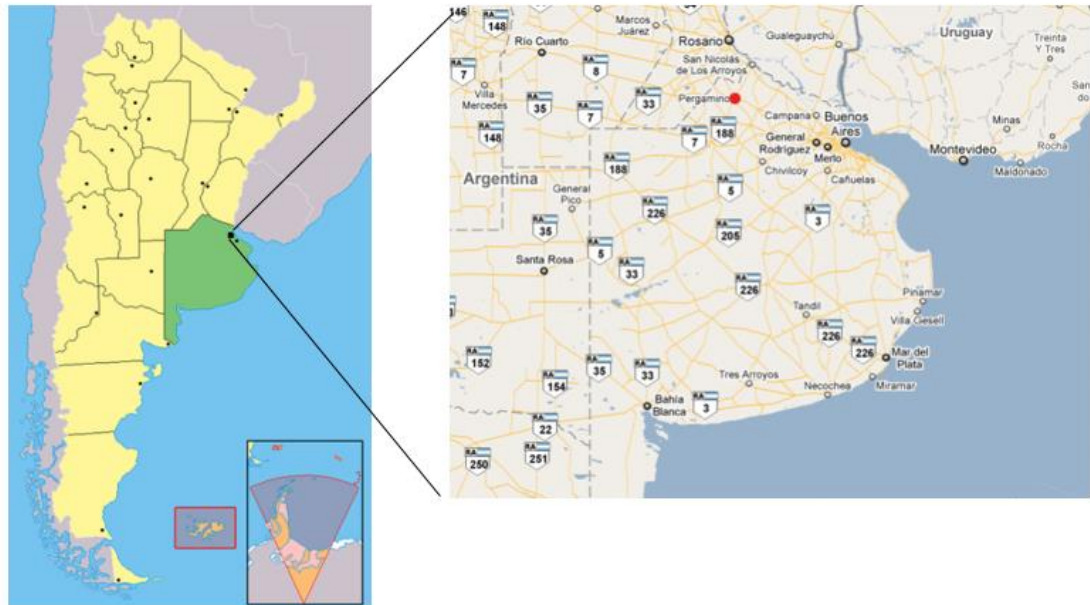


Figura 4.1. Zona de estudio

Dentro de la región pampeana y en el sistema del Río Paraná se encuentra la cuenca del Río Arrecifes que linda al sur con el Sistema del Río de la Plata (SSRH INA, 2002). El río Arrecifes nace aguas arriba de la ciudad homónima, a partir de la confluencia de los arroyos Salto y Pergamino (Fig.4.2.) y desemboca en el delta del río Paraná (Salgado & Días, 2014).

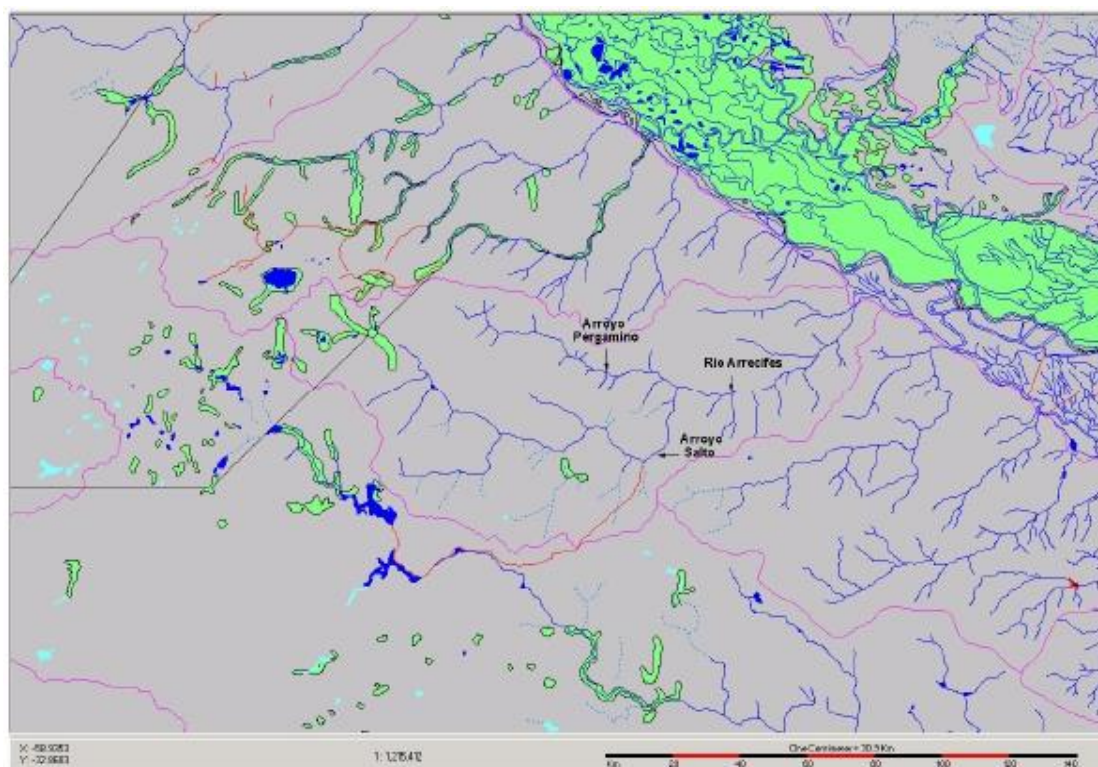


Figura 4.2. Límite (divisoria de aguas) de la cuenca del río Arrecifes (en violeta), red hidrográfica (en azul) y bañados (en verde). Fuente: Atlas de RRHH superficiales RA (SSRH INA, 2002).

Estrechamente relacionados a estos cursos superficiales de agua se encuentran los acuíferos subterráneos, otro importantísimo recurso. El Acuífero Puelche es el principal en la región y es también el más utilizado del país, pues de él se abastece gran parte del Conurbano de Buenos Aires y ciudades como Pergamino (Auge, 2004).

La zona de estudio elegida como representativa de la región Pampeana es la subregión oeste de la cuenca del arroyo Pergamino (Provincia de Buenos Aires, Argentina) porque desde mediados de la década de los años noventa registra un proceso de intensificación agrícola, caracterizado por el uso creciente de agroquímicos junto con la adopción del sistema de siembra directa (Agropanorama, 2016). La cuenca del Arroyo Pergamino (Fig. 4.3.) incluye toda el área de aporte al escurrimiento superficial hasta la convergencia con el Arroyo Salto.

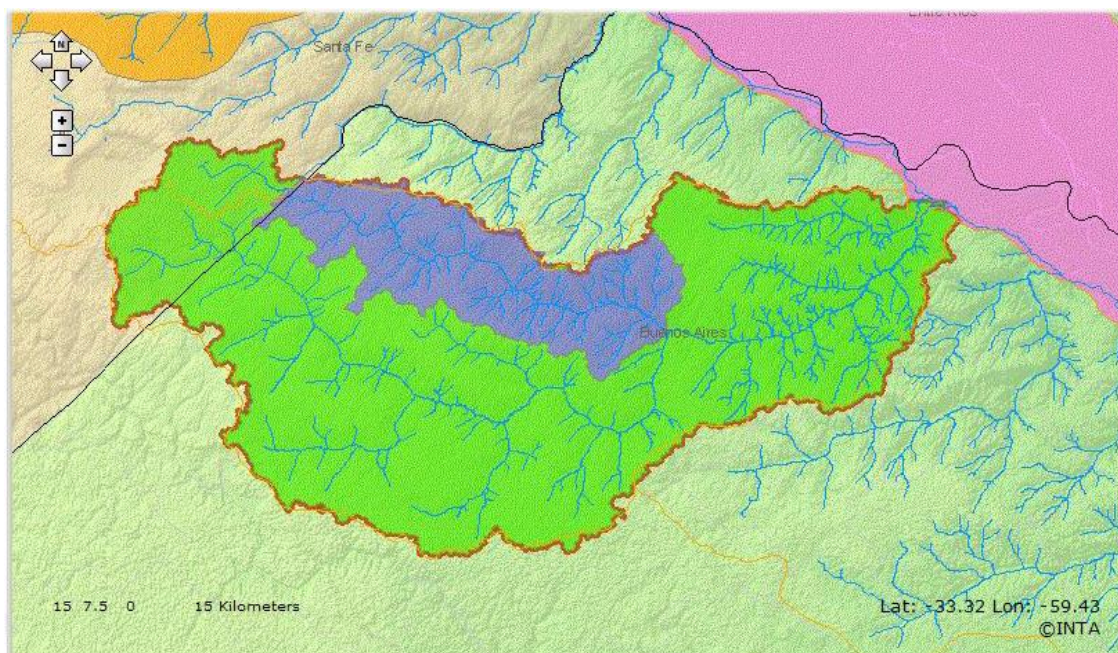


Figura 4.3. Mapa de la zona de estudio. La cuenca del Arroyo Pergamino, en color celeste, discurre en el partido del mismo nombre y abarca una superficie aproximada de 2019 km² que se encuentra al norte de la Pampa Ondulada, en la provincia de Buenos Aires. Fuente: Aportación del Proyecto Cuencas Hidrográficas, Inst. Clima y Agua, INTA Castellar. GEOINTA.

En la cuenca media se encuentra la localidad de Pergamino, cuya población es de 110000 habitantes (<http://www.pergamino.gob.ar/>). En la ciudad cabecera habitan 95000 personas, 10000 residen en los 12 pueblos de campaña del partido y 5000 corresponden a la población rural, ocupando en total una superficie de 2950 km². La ciudad posee un parque industrial de 70 ha, ubicado sobre la margen derecha del arroyo, a 2 km aguas abajo del centro urbano. En la otra margen y casi enfrente al parque industrial se encuentran la planta de tratamiento de efluentes cloacales y la planta de procesamiento de residuos sólidos domiciliarios. El área destinada a la actividad agropecuaria supera el 95% debido al alto tenor en materia orgánica y a la penetración en profundidad de la misma. La rotación más común en la zona es la que combina cultivos de gramíneas – trigo (*Triticum* spp.) y maíz (*Zea mays*) – con las oleaginosas – soja o girasol (*Helianthus annuus*) – de tal manera que el uso de agroquímicos no sólo es frecuente sino también cada vez más intenso. Por lo tanto los cursos hídricos

adyacentes están expuestos a un alto impacto de contaminantes que llegan a ellos y deterioran su calidad, amenazando además la integridad de los ecosistemas y la salud del hombre.

Se seleccionaron veinte puntos de muestreo para abarcar la heterogeneidad de usos de suelo de la zona, desde campos agrícolas hasta aguas que discurren por zona urbana (Fig. 4.4.).

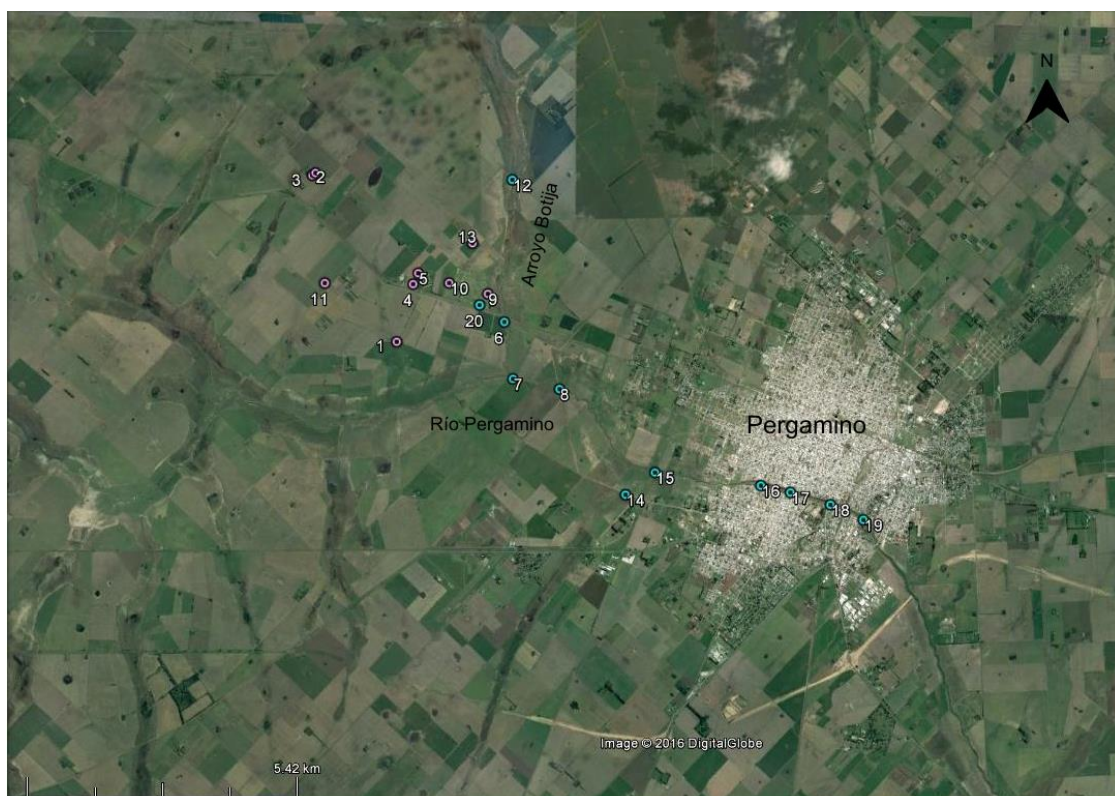


Figura 4.4. Imagen satelital de la zona de estudio. Localización de los puntos de monitoreo en la cuenca del río Pergamino.

Como se dijo anteriormente, entre los puntos de muestreo se diferenciaron ARSub, ARS y AUS (Cuadro 4.1.). Las muestras 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11 y 13 fueron ARSub de la cuenca del río Pergamino. Los puntos se localizaron en la parte Noreste del río Botija teniendo en cuenta la dirección del agua subterránea ubicada en zonas deprimidas con suelos drenaje deficiente (INTA, 1972; Sainato et al., 2000). Los sitios 2, 3 y 11 se utilizan como agua potable para consumo humano. Las muestras de ARS 6,

8, 12, 14, 15 fueron tomadas en la cuenca del arroyo Botija, afluente principal del río Pergamino. La 7 también de tipo ARS, fue relevada en la confluencia del arroyo Botija con el río Pergamino, mientras que la 20 fue de un lago artificial. Todos estos sitios de monitoreo se encuentran aguas arriba de la ciudad de Pergamino. Por el contrario, los puntos de AUS 16 a 19 pertenecen al río Pergamino a su paso por la ciudad del mismo nombre.

Sitios	Tipo de muestra	Localización	Características
1	ARSub	S: 33° 52 m 32,8 s; O: 060° 39 m 47,9 s; Profundidad: 77 m	Lote agrícola. Agua de pozo con molino
2	ARSub	S: 33° 50 m 43,2 s; O: 060° 40 m 52,8 s; Profundidad: 18 m	Actividades agrícolas y de granja. Agua de pozo con molino, para consumo humano
3	ARSub	S: 33° 50 m 43,2 s; O: 060° 40 m 52,9 s; Profundidad: 70 m	
4	ARSub	S: 33° 51 m 51,6 s; O: 060° 39 m 364,6 s; Profundidad: 38-41 m	Sistema de irrigación por pivote. 10 años de antigüedad
5	ARSub	S: 33° 51 m 51,6 s; O: 060° 39 m 364,6 s; Profundidad: 40 m	Sistema de irrigación por pivote. 1 año de antigüedad
6	ARS	S: 33° 52 m 18,6 s; O: 060° 38 m 23,8 s; Profundidad: 69 m	Agua de río
7	ARS	S: 33° 52 m 55,7 s; O: 060° 38 m 19,3 s; Profundidad: 63 m	Agua de río. Confluencia de los ríos Botija y Pergamino
8	ARS	S: 33° 53 m 02,3 s; O: 060° 37 m 42,8 s; Profundidad: 57 m	Agua de río
9	ARSub	S: 33° 52 m 00,4 s; O: 060° 38 m 39,0 s; Profundidad: 37 m	Emprendimiento rural. Las muestras fueron tomadas de piezómetros de 40 años de antigüedad
10	ARSub	S: 33° 51 m 53,4 s; O: 060° 39 m 09,2 s; Profundidad: 48 m	

Continúa en la página siguiente

Sitios	Tipo de muestra	Localización	Características
11	ARSub	S: 33° 51 m 53,4 s; O: 060° 40 m 46,6 s; Profundidad: 79 m	Jardín orgánico. Rodeada de campos de soja. Molino de agua de 30 m de profundidad. Para consumo humano
12	ARS	S: 33° 50 m 46,4 s; O: 060° 38 m 17,9 s; Profundidad: 67 m	Agua de río
13	ARSub	S: 33° 51 m 27,5 s; O: 060° 38 m 51,0 s; Profundidad: 78 m	Lote agrícola. Agua de pozo con molino
14	ARS	S: 33° 54 m 12,1 s; O: 060° 36 m 48,3 s; Profundidad: 70 m	Basural en desuso con un arroyo que lo atraviesa
15	ARS	S: 33° 54 m 07,2 s; O: 060° 35 m 28,6 s; Profundidad: 53 m	Agua de río
16	AUS	S: 33° 54 m 05,0 s; O: 060° 35 m 05,1 s; Profundidad: 56 m	Puentes sobre el río Pergamino, en zona urbana
17		S: 33° 54 m 10,9 s; O: 060° 34 m 39,2 s; Profundidad: 57 m	
18		S: 33° 54 m 17,4 s; O: 060° 34 m 10,6 s; Profundidad: 57 m	
19		S: 33° 54 m 27,2 s; O: 060° 33 m 44,8 s; Profundidad: 58 m	
20	ARS	S: 33° 52 m 09,2 s; O: 060° 38 m 43,1 s; Profundidad: 71 m	Lago artificial

Cuadro 4.1. Caracterización de los puntos de muestreo en la cuenca de Pergamino. Las coordenadas fueron localizadas con el sistema oficial Posgard 94 para referencias geodésicas. ARSub = aguas rurales subterráneas; ARS = aguas rurales superficiales; AUS = aguas urbanas superficiales.

4.2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue la caracterización de la calidad y del estado toxicológico de muestras de agua en la cuenca del río Pergamino.

Los objetivos específicos fueron:

1. Caracterización de las muestras (superficiales y subterráneas), mediante el uso de parámetros fisicoquímicos.
2. Cálculo de un ICA.
3. Determinación y cuantificación de glifosato y AMPA.
4. Realización del bioensayo con *C. elegans* para la evaluación de los riesgos toxicológicos.
5. Comparación de los resultados del bioensayo con la caracterización fisicoquímica.
6. Construcción de un índice de categorización de efectos tóxicos a partir de los valores de crecimiento relativo del nematodo.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Análisis de parámetros fisicoquímicos

En el cuadro 4.2. se muestran la media, la mediana, el mínimo y el máximo del conjunto de datos, de los 7 meses monitoreados. Se vio un amplio rango de valores entre los sitios, en función de su origen.

Sitio	T°C	pH	CE	ORP	HCO ³⁻	NO ³⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	Gli	AMPA
			µS cm ⁻¹		meq L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	µg L ⁻¹	µg L ⁻¹
ARSub														
Media	22,1	7,8	1046	119	9,7	45	38,2	36	81,4	9,1	171,8	8,1	1,45	1,89
Median	20,3	7,8	1040	126	9,8	47	54,5	36	74,5	8,8	175,3	7,2	0,89	1,53
1 DE	6,0	0,1	83	33	0,3	4	24,4	0	49,3	11,1	128,1	5,5	1,70	1,17
Min	18,3	7,6	967	71	9,5	39	11,0	36	36,0	2,0	83,3	5,7	0,20	0,94
Max	33,4	7,9	1194	154	10,0	48	65,2	36	170,5	29,5	415,5	20,0	3,82	3,19
Media	21,0	7,4	1711	134	13,5	28	86,5	103	79,4	11,5	251,7	8,0	1,12	2,50
Median.	19,4	7,4	1735	132	13,5	26	83,5	89	79,9	10,4	260,0	8,7	0,41	2,50
2 DE	3,6	0,1	132	26	0,9	9	16,3	44	71,4	13,3	103,9	2,1	1,62	0,87
Min	18,3	7,3	1505	114	12,5	21	68,0	71	30,4	4,7	123,7	4,0	0,12	1,89
Max	28,2	7,7	1883	179	15,0	47	111,4	178	240,5	35,0	391,5	11,0	3,52	3,11
Media	19,9	7,5	1553	121	12,4	17	66,9	85	62,9	8,0	261,6	6,3	0,86	0,74
Median.	19,5	7,6	1513	117	12,5	16	69,0	89	57,1	5,8	242,0	6,3	0,72	0,74
3 DE	2,7	0,1	160	53	1,0	3	10,7	23	58,8	9,5	109,5	1,5	0,74	0,67
Min	16,0	7,4	1364	69	11,5	14	55,2	53	21,3	3,1	124,0	4,6	0,20	0,27
Max	23,7	7,7	1777	213	14,0	21	79,8	107	196,0	28,5	421,0	9,0	1,90	1,21
Media	20,7	8,0	1221	120	10,0	28	68,7	57	27,1	3,7	210,2	1,9	1,04	6,00
Median.	21,3	8,0	1189	121	10,0	32	70,0	53	33,5	2,7	221,0	3,2	0,79	6,00
4 DE	3,3	0,3	127	30	1,8	5	8,8	15	39,6	4,2	58,0	1,5	0,69	6,00
Min	14,5	7,5	1073	89	8,0	22	55,5	36	4,1	1,7	116,2	0,1	0,27	6,00
Max	24,3	8,4	1452	160	13,0	34	77,3	71	113,5	13,0	276,5	4,5	1,97	6,00
Media	20,7	8,0	1490	111	10,7	27	68,4	120	71,7	5,3	290,1	4,3	0,86	2,04
Median.	20,2	8,0	1480	108	10,8	26	80,0	115	89,8	5,0	295,0	4,6	0,27	2,04
5 DE	2,0	0,2	133	47	0,6	4	20,7	62	72,1	6,7	133,0	0,7	1,09	2,24
Min	19,0	7,7	1356	74	10,0	24	40,4	53	23,9	2,0	124,7	3,5	0,20	0,46
Max	23,7	8,3	1680	180	11,5	35	84,8	195	203,5	19,5	521,5	5,0	2,12	3,63

Continúa en la página siguiente

Sitio	T°C	pH	CE	ORP	HCO ³⁻	NO ³⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	Gli	AMPA
			µS cm ⁻¹		meq L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	µg L ⁻¹	µg L ⁻¹
Media	19,6	7,6	1385	126	13,6	21	59,1	36	66,3	10,5	260,9	6,4	1,36	3,24
Median	18,4	7,6	1434	126	13,5	22	77,1	36	75,9	11,5	318,0	6,5	1,53	3,46
9 DE	3,3	0,1	224	20	0,5	14	23,7	0	108,0	14,9	102,4	1,8	0,86	2,40
Min	16,0	7,5	1008	102	13,0	10	35,9	36	7,9	3,8	111,1	3,9	0,42	0,74
Max	25,0	7,7	1647	155	14,5	50	83,0	36	323,5	46,5	422,5	10,0	2,12	5,52
Media	19,7	7,5	895	152	9,6	22	46,6	25	97,2	30,7	136,2	11,2	0,41	2,27
Median	19,7	7,5	1007	151	9,5	21	51,3	18	99,6	22,2	185,0	14,3	0,27	2,24
10 DE	2,1	0,1	219	25	0,7	2	18,7	10	69,6	58,4	86,6	7,2	0,34	1,69
Min	17,6	7,3	518	127	8,5	20	25,1	18	38,0	11,3	27,0	2,4	0,20	0,60
Max	23,7	7,7	1141	183	10,5	25	70,8	36	228,5	172,5	278,5	25,5	1,01	3,98
Media	20,7	8,0	1322	119	9,4	49	75,8	92	43,2	3,3	256,9	3,3	1,07	1,87
Median	19,7	8,0	1273	121	10,0	61	75,4	89	42,4	2,1	276,0	3,3	0,98	1,87
11 DE	4,7	0,3	122	28	1,2	22	3,4	23	83,2	6,0	124,0	1,1	0,95	2,26
Min	15,0	7,3	1169	88	8,0	13	72,1	71	5,5	1,6	112,3	2,2	0,20	0,27
Max	29,5	8,3	1472	164	1,0	75	79,6	124	252,5	18,0	431,0	5,5	2,12	3,47
Media	20,4	7,8	1315	114	10,7	32	76,2	36	29,1	3,0	216,9	3,2	0,84	1,73
Median	20,0	8,0	1336	127	11,0	33	76,5	36	28,5	2,8	228,0	3,1	0,20	1,73
13 DE	2,8	0,3	131	37	1,0	5	2,5	22	63,7	2,3	90,2	0,5	1,34	0,00
Min	16,5	7,3	1120	55	9,5	24	72,0	0	2,2	1,4	115,8	2,5	0,12	1,73
Max	24,6	8,1	1462	170	12,0	38	78,6	71	192,5	7,4	378,5	4,0	2,86	1,73
ARS														
Media	21,4	8,3	2286	123	13,1	12	64,0	298	68,9	14,7	368,1	9,2	1,02	0,80
Median	21,1	8,3	2320	121	13,5	12	90,8	302	67,8	16,5	380,0	10,3	1,09	0,30
6 DE	4,4	0,2	214	25	1,5	4	55,5	85	73,4	10,8	159,5	2,2	0,55	1,06
Min	14,7	7,9	1942	98	11,0	8	8,9	213	31,0	4,9	148,0	6,1	0,40	0,07
Max	28,8	8,7	2570	153	15,0	19	143,2	391	245,0	39,0	601,0	12,1	1,75	2,02

Continúa en la página siguiente

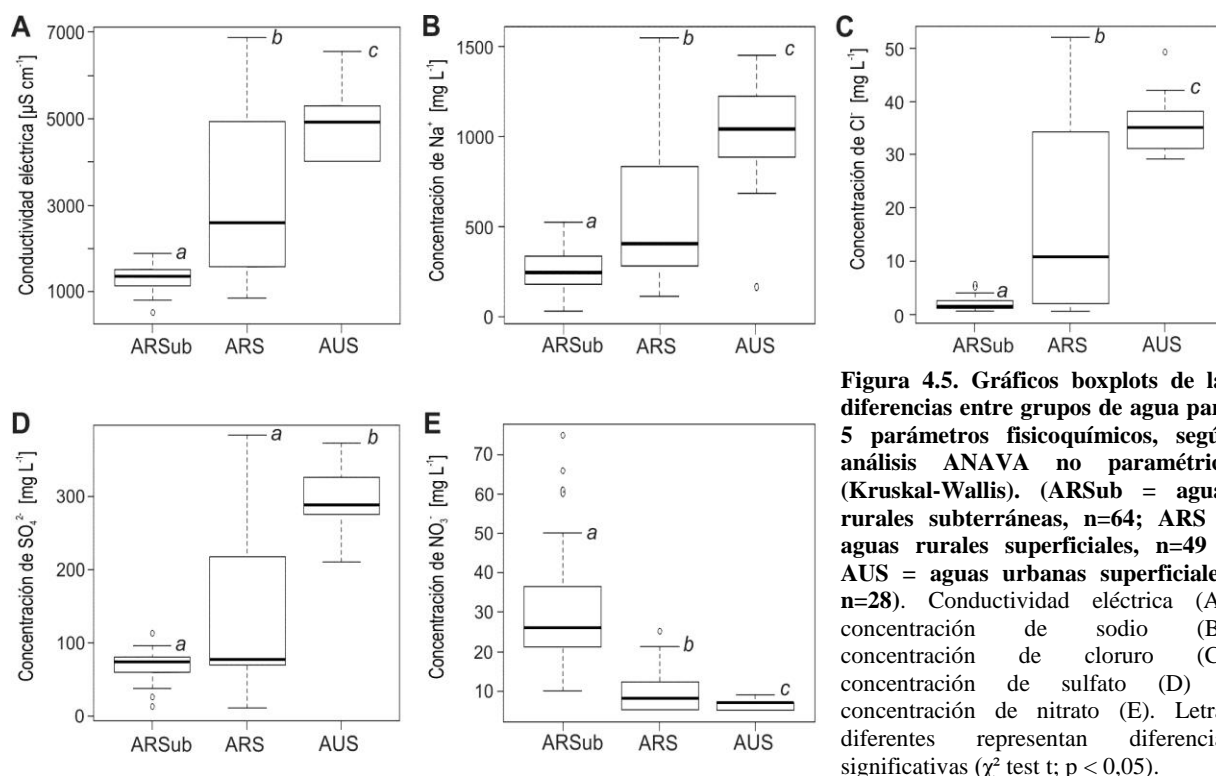
Sitio	T°C	pH	CE	ORP	HCO ³⁻	NO ³⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	Gli	AMPA
			µS cm ⁻¹		meq L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	µg L ⁻¹	µg L ⁻¹
Media	18,7	8,4	4444	110	12,7	9	103,4	951	127,3	48,3	698,1	28,9	0,82	2,05
Median.	19,8	8,5	4560	132	13,0	8	72,3	1083	151,1	40,2	935,3	31,3	0,64	2,31
7 DE	5,6	0,2	778	31	0,9	8	126,9	547	79,3	44,9	379,2	8,8	0,71	0,52
Min	10,5	8,0	3363	77	11,5	5	67,3	0	42,8	26,8	163,0	15,1	0,27	1,45
Max	27,4	8,7	5620	140	13,5	25	324,4	1385	249,0	143,0	1177,5	39,2	1,75	2,40
Media	19,4	8,3	5004	113	12,7	6	128,3	941	119,2	54,8	750,7	39,0	0,86	3,98
Median.	19,5	8,4	5080	133	13,0	5	75,0	1189	111,1	45,1	927,0	40,1	0,57	4,22
8 DE	4,7	0,3	920	28	1,0	1	144,9	756	87,5	64,2	367,4	20,7	0,64	0,45
Min	11,3	7,9	3999	79	11,0	5	66,1	0	34,7	27,3	161,5	16,3	0,42	3,47
Max	25,4	8,7	6640	139	13,5	7	381,7	1846	283,5	206	1252,0	84,5	1,60	4,26
Media	20,4	8,2	2508	79	13,3	12	115,0	364	46,9	13,6	390,8	7,6	0,25	2,00
Median.	21,0	8,2	2498	117	13,6	11	118,9	355	52,0	13,3	387,5	12,0	0,20	1,53
12 DE	5,8	0,1	395	55	1,6	5	36,7	117	18,7	15,9	104,4	4,5	0,16	1,33
Min	12,8	8,0	1960	11	11,5	8	75,5	249	26,4	6,2	278,0	2,6	0,12	0,98
Max	28,5	8,3	2920	154	14,8	21	164,4	497	77,4	45,0	566,0	12,4	0,49	3,51
Media	19,8	8,4	1491	109	12,6	8	68,0	56	64,5	19,5	261,0	6,5	0,72	1,10
Median.	22,4	8,3	1544	107	12,8	8	69,3	71	63,5	17,2	288,5	6,1	0,72	1,00
14 DE	4,7	0,4	132	25	0,9	8	7,4	28	70,8	42,3	110,5	3,8	0,53	0,73
Min	10,9	7,9	1227	75	11,5	5	56,1	0	26,2	5,9	137,5	3,0	0,22	0,42
Max	23,9	9,1	1643	137	14,0	25	74,7	71	233,0	125,5	465,5	15,0	1,53	1,88
Media	21,3	8,4	5088	118	12,4	7	306,9	1377	125,1	55,1	757,6	33,3	0,50	5,46
Median.	20,9	8,4	5210	110	12,3	7	290,8	1278	117,0	51,1	1014,5	35,5	0,49	5,46
15 DE	4,5	0,3	988	19	1,2	3	42,2	270	112,2	45,1	452,9	15,1	0,13	5,74
Min	15,5	7,9	3999	101	11,3	5	271,5	1136	34,9	27,4	160,0	14,3	0,38	1,40
Max	29,2	8,7	6860	144	14,0	15	374,1	1811	361,0	148,5	1548,5	64,0	0,72	9,52

Continúa en la página siguiente

Sitio	T°C	pH	CE	ORP	HCO ³⁻	NO ³⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	Gli	AMPA
			µS cm ⁻¹		meq L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	µg L ⁻¹	µg L ⁻¹
Media	21,3	9,3	947	92	6,2	7	48,0	18	49,2	3,8	225,0	3,7	0,96	1,49
Median.	21,4	9,4	927	100	6,1	5	46,5	18	47,5	2,8	240,8	3,3	0,79	1,49
20 DE	5,1	0,4	116	25	1,1	10	4,4	16	73,3	14,1	119,6	2,7	0,47	1,12
Min	15,0	8,5	830	68	5,0	5	44,8	0	20,0	1,4	112,7	2,0	0,41	0,70
Max	30,5	9,7	1150	122	7,8	25	54,7	36	215,5	37,0	405,0	9,5	1,53	2,28
AUS														
Media	21,3	8,4	4672	110	12,0	6	276,5	1235	129,2	52,9	824,6	30,7	0,50	3,93
Median.	21,3	8,5	4680	107	12,5	5	286,3	1243	104,9	44,0	1064,0	33,4	0,42	3,67
16 DE	4,6	0,3	573	19	2,3	1	47,0	147	117,7	46,4	421,0	8,4	0,44	2,89
Min	14,2	7,9	3999	92	8,5	5	209,7	1101	56,7	30,8	163,2	19,5	0,20	0,66
Max	28,7	8,8	5420	141	15,0	7	340,0	1456	406,5	157,0	1353,0	41,5	1,45	7,70
Media	21,3	8,4	4939	111	12,5	7	312,8	1338	129,7	50,9	821,0	32,1	1,59	11,35
Median.	21,4	8,4	5030	109	12,5	7	308,2	1243	110,0	49,7	1161,0	32,7	0,64	2,60
17 DE	5,0	0,3	867	20	0,6	2	47,2	243	108,8	41,0	421,1	8,8	2,33	18,38
Min	15,0	7,9	3999	94	12,0	5	266,6	1101	31,3	27,6	161,6	16,4	0,24	1,30
Max	30,5	8,8	6550	142	13,5	9	372,7	1740	321,5	146,0	1369,5	43,5	6,77	38,89
Media	20,4	8,4	4632	86	12,6	7	282,7	846	146,5	58,8	738,8	34,4	1,07	43,19
Median.	21,7	8,5	4705	109	12,4	7	286,1	1136	171,0	44,6	925,2	33,6	0,72	5,02
18 DE	6,3	0,3	666	37	0,6	1	35,5	672	101,3	54,4	367,8	14,1	0,80	79,59
Min	12,1	7,7	3999	31	12,3	6	239,5	0	39,5	33,1	162,7	19,8	0,27	0,34
Max	30,4	8,7	5370	124	13,5	9	325,9	1491	326,0	169,0	1221,5	62,0	2,21	162,40
Media	21,6	8,4	4566	108	12,9	7	299,2	1251	159,3	54,0	801,2	32,7	1,31	16,12
Median.	20,8	8,5	4460	109	12,9	6	296,6	1278	198,4	43,3	1002,2	33,9	0,19	0,11
19 DE	4,7	0,2	687	27	0,7	2	23,4	110	93,5	32,0	437,2	6,6	0,74	5,78
Min	15,7	8,0	3999	80	12,0	5	279,5	1101	52,2	33,7	163,5	24,4	0,57	1,10
Max	28,9	8,7	5400	145	13,8	9	326,6	1349	325,0	109,0	1445,5	41,0	0,53	8,97

Cuadro 4.2. Parámetros fisicoquímicos y concentraciones de glifosato y AMPA en las muestras de agua. Para cada sitio se calcularon los parámetros estadísticos a partir de un n=7 (meses de muestreo). Median.= mediana. TSD= total de sólidos disueltos; CE= conductividad eléctrica; ORP= potencial de óxido reducción; Gli = glifosato; AMPA = ácido aminometil fosfónico; DE= Desviación estándar; Min= mínimo valor; Max= máximo valor. ARSub = aguas rurales subterráneas; ARS = aguas rurales superficiales; AUS = aguas urbanas superficiales. Se presentan los bicarbonatos que son los predominantes en el balance iónico, aunque los carbonatos fueron también considerados.

La temperatura presentó un gran rango de amplitud, variando desde los 10 a 33 °C, de acuerdo con la fluctuación estacional. Para los valores de ORP, no se detectaron diferencias particulares siendo todos positivos entre 11 y 200 mV. En la Fig. 4.5. se muestran en gráficos boxplot los resultados del análisis ANAVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) de determinados parámetros fisicoquímicos para los tres grupos de muestras de agua, discriminando por origen. Se graficaron aquellos parámetros en los que se encontraron diferencias significativas relevantes. En cuanto a la CE (Fig. 4.5.A) se observó una variación drástica entre los grupos, encontrando diferencias significativas entre los tres (χ^2 ; $p < 0,05$). Mientras que las ARSub presentaron un rango desde 518 a 1,680 $\mu\text{S cm}^{-1}$, lo que indica una condición moderadamente salina, en ARS y AUS fue mayor, con valores desde 860 a 6640 $\mu\text{S cm}^{-1}$ y desde 4000 a 6860 $\mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente. El valor obtenido para AUS indica una condición de alta salinidad probablemente debido a los efluentes urbanos y domésticos que contribuyen al deterioro del medio hídrico. La guía para la calidad del agua de riego de la Universidad de California señaló que los valores de CE superiores a 1500 $\mu\text{S cm}^{-1}$ estarían indicando un riesgo moderado de salinización y consecuentemente se clasifica como no-permisible para fines de riego (UCCC, 1974). Teniendo en cuenta este criterio, tanto las ARS como las AUS están lejos de alcanzar un buen criterio de calidad para uso agrícola.



La concentración de Na^+ reveló un perfil similar a la CE, presentando los valores más bajos en las ARSub y los más altos en las AUS. La comparación entre los tres grupos de agua reveló diferencias significativas (χ^2 ; $p < 0,05$) (Cuadro 4.2. y Fig. 4.5.B). Las concentraciones del ion Cl^- fueron superiores en las AUS seguido por las ARS, mientras que los valores más bajos se encontraron en las ARSub. Como se puede observar en la Fig. 4.5.C., hubo diferencias altamente significativas entre el grupo de ARSub y AUS (χ^2 ; $p < 0,05$). Además, en todas las muestras de AUS, así como en los sitios 7, 8 y 15 de ARS, los valores de Cl^- superaron el límite establecido por la normativa local para la protección de la vida acuática (625 mg L^{-1} Resolución 42/06). Respecto a SO_4^{2-} , las concentraciones más bajas fueron en las muestras de ARSub y ARS, sin diferencias significativas entre los dos grupos (Cuadro 4.2. y Fig. 4.5.D). Sin embargo, sí que las hubo al comparar cada uno de esos grupos con las AUS (χ^2 ; $p < 0,001$). Varios informes han demostrado que los iones Cl^- y SO_4^{2-} permanecen en la superficie en forma de sales debido a la evaporación de las aguas subterráneas,

posteriormente pueden ser levantadas por el viento, retornadas al suelo de nuevo y finalmente ser lavados por la lluvia (Ferraris & Couretot, 2008). Por otro lado, los efluentes urbanos podrían estar contribuyendo a esa alta concentración iónica que puede estar alterando la calidad del agua. En cuanto a los cationes tales como Mg^{2+} , Ca^{2+} y K^{+} , las AUS presentaron la mayor concentración. Este fenómeno puede atribuirse a una preponderancia de la condición mineral del acuífero (Auge, 2006). En el caso del pH, todas las aguas se caracterizaron por ser neutras o alcalinas, con un pequeño rango en las ARSub (7,29 a 8,40) y uno mayor para ARS y AUS (de 7,74 a 8,83 y de 7,93 a 9,70 respectivamente) (Cuadro 4.2.). El valor más alto de pH se encontró en el sitio de monitoreo 14 que se encuentra en un arroyo que atraviesa un antiguo basural (Cuadro 4.1.). Cabe mencionar que un pH alcalino, superior a 9, podría poner en peligro la vida acuática (Res N° 42/06 -. Autoridad del Agua de la provincia de Buenos Aires). Todas las muestras de agua en el área de estudio mostraron un equilibrio iónico entre carbonatos y bicarbonatos hacia estos últimos, en consonancia con los valores de pH medidos y de acuerdo con la composición de los sedimentos del acuífero (Heredia et al., 2014; INTA, 1972).

Como se mencionó anteriormente, las muestras de agua subterráneas pueden dividirse en aquellas que son de pozo, con molino para el bombeo y extracción, utilizados para riego (1 y 13) o para el consumo humano (2, 3 y 11), provenientes de un sistema de riego con pivote (4 y 5) y las que son tomadas con un freatómetro dispuesto para el monitoreo del nivel de la napa freática (sitios 9 y 10). El análisis reveló que en los sitios 2 y 11, las concentraciones de NO_3^{-} no cumplieron con la normativa para agua potable ($<45 \text{ mg L}^{-1}$) (Cuadro 4.2.). De hecho, el punto 11 presentó la más alta a lo largo del año, con valores promedios de alrededor de 65 mg L^{-1} , lo cual implican riesgos para el agua de consumo humano. También en los sitios 1 y 9 se encontraron altas

concentraciones de NO_3^- , aunque estos se utilizan para fines de riego (sitio 1) o para control del nivel de la napa (sitio 9) lo cual no representaría un riesgo para la salud humana. En los puntos 1, 2 y 3 se produjo un aumento de la concentración de este parámetro en septiembre, posiblemente debido a los fertilizantes utilizados en las actividades agrícolas; sin embargo en el caso de las AUS y ARS fueron menores en todas las muestras en comparación con las ARSub, con una variación muy pequeña entre los meses. El análisis reveló diferencias significativas respecto a las concentraciones de NO_3^- entre las aguas subterráneas y los dos grupos de aguas superficiales (χ^2 ; $p < 0,001$) (Fig. 4.5.E).

En cuanto a la concentración de metales (datos no mostrados) sólo se detectó la presencia de Cd^{2+} en octubre y noviembre para todas las muestras con la excepción de los sitios 11, 12, 19 y 20. El valor máximo fue $0,019 \text{ mg L}^{-1}$ y el mínimo fue $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$ (que superó el límite de regulación de $0,0002 \text{ mg L}^{-1}$). No se encontró Cu^{2+} y Pb en la mayoría de los sitios, excepto en el 11 ($0,174 \text{ mg L}^{-1}$) y 13 ($0,26 \text{ mg L}^{-1}$) en el mes de agosto. Ambos valores excedieron el límite de la normativa de $0,002 \text{ mg L}^{-1}$. Se encontró Fe^{2+} solamente en el sitio de monitoreo 5 durante agosto, con un valor de $2,3 \text{ mg L}^{-1}$, superando también el límite de regulación de 2 mg L^{-1} . No hubo Mg^{2+} en ninguna de las muestras de agua. En el caso de Mn^{2+} en todos los puntos la concentración fue inferior al límite de la normativa, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. La presencia de Zn^{2+} fue detectada en todos los sitios de ARSub, excediendo el límite ($0,0075 \text{ mg L}^{-1}$) (Resolución 42/06). En el caso del 2 y el 3, usados como suministro de agua potable, esto ocurre en los 7 meses monitoreados, alcanzando un valor máximo de $0,721 \text{ mg L}^{-1}$. Con respecto a aguas superficiales, la concentración de Zn^{2+} se excedió según la reglamentación en todos los sitios al menos una vez, con la excepción del 14.

4.3.2. Caracterización hidrogeoquímica

El diagrama de Piper para las ARSub se presenta en la Fig. 4.6.A.; todos los sitios se clasificaron como aguas sodio-potasio bicarbonatadas, lo cual está en concordancia con estudios anteriores de aguas superficiales y subterráneas en la zona Pergamino-Arrecifes (Auge, 2006; Losinno et al., 2002, 2005). Cabe destacar que el sitio 10 difirió del resto del grupo de las ARSub, con más predominancia de Ca^{2+} y menos concentración de Na^+ y K^+ , coincidente con los bajos valores de CE encontrados en este punto (Cuadro 4.2.). En el caso de las ARS (Fig. 4.6.B) los aniones se distribuyeron regularmente por toda la parte inferior del triángulo, mientras que los cationes estuvieron concentrados en la parte inferior derecha. Como resultado, este grupo de muestras de agua presentó una distribución más heterogénea desde una categoría sodio-potasio bicarbonatada (sitios 14 y 20) hacia cloruro sódica (sitios 7, 8 y 15). Esta particular disposición coincide con una direccionalidad norte sur a lo largo del río Botija: las muestras aguas arriba (6 y 12), tuvieron un patrón mixto que se hizo más clorado río abajo hacia los sitios 7, 8 y 15. Esta observación podría indicar una posible contaminación debido al intenso uso agrícola en las zonas rurales. Esta polución va aumentando cuanto más cerca de la ciudad, lo cual coincide con la información revelada en el análisis de parámetros fisicoquímicos. En la Fig. 4.6.C, donde se representa el diagrama de Piper para las AUS, se muestra una distribución homogénea de estas aguas en la categoría hidrogeoquímica de sodio cloradas. Los sitios de las ARSub y ARS son químicamente similares, lo que podría estar indicando una posible infiltración de las aguas superficiales en la napa freática.

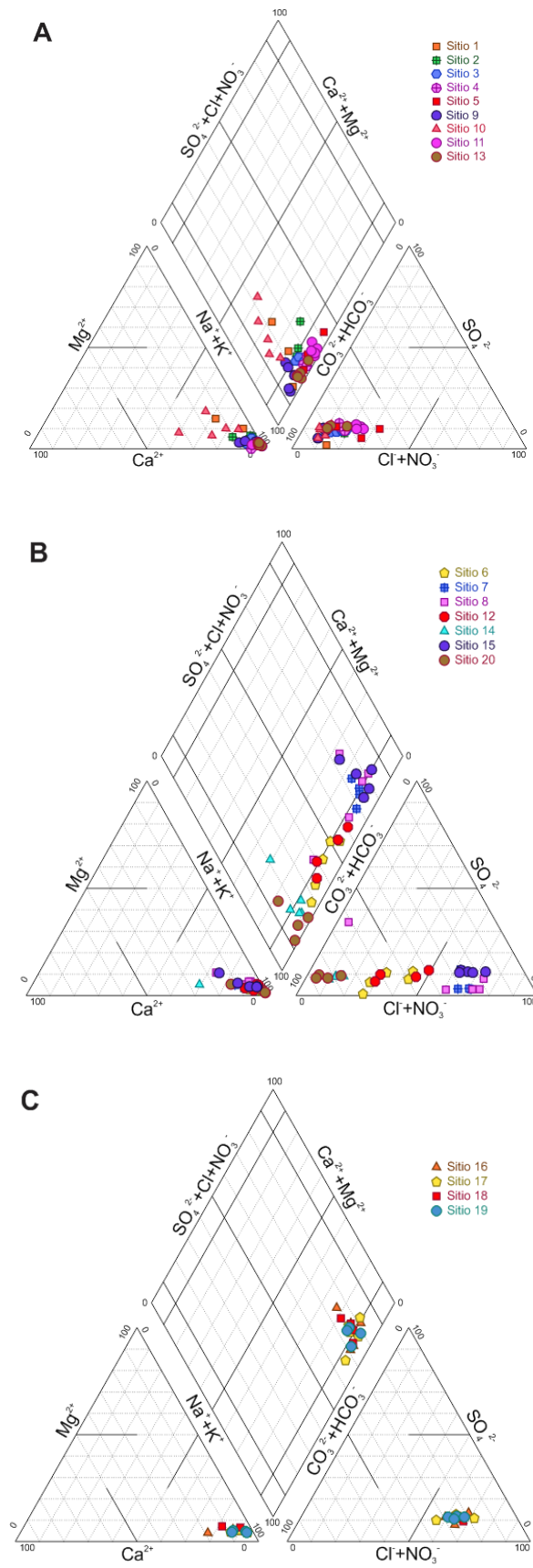


Figura 4.6. Diagrama de Piper para los diferentes puntos de monitoreo. (A) ARSub= aguas rurales subterráneas; (B) ARS = aguas rurales superficiales; (C) AUS = aguas urbanas superficiales.

4.3.3. Cálculo del ICA

En la fig. 4.7. se muestran los valores del ICA anual calculado para las muestras de agua. De acuerdo con el CCME, todos pertenecen a la categoría *buena*, *media* o *mala* calidad de agua.

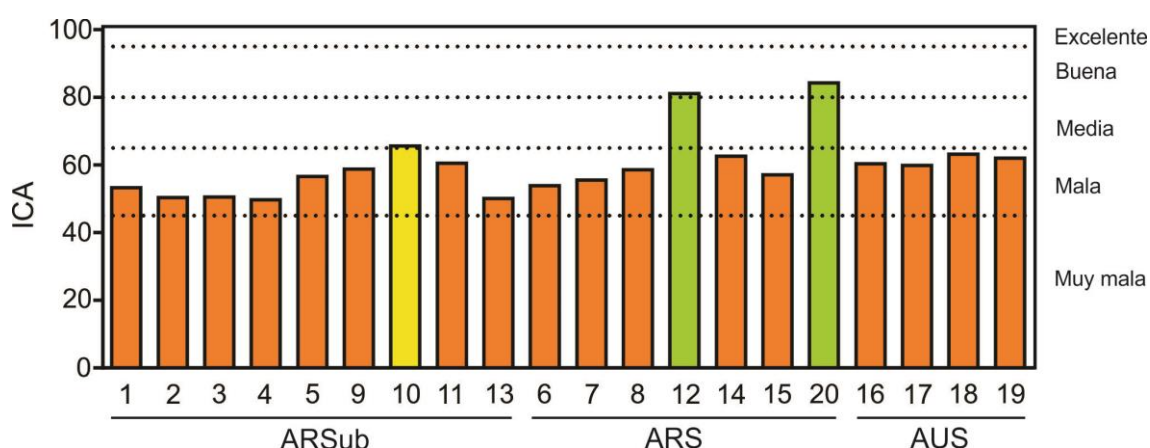


Figura 4.7. Valores del ICA de los sitios de monitoreo de la cuenca del río Pergamino. ARSub = aguas rurales subterráneas; ARS = aguas rurales superficiales; AUS = aguas urbanas superficiales; n=7.

La mayoría de las ARSub mostraron una categoría *mala*, con valores que oscilaron entre 49,7 y 60,5, excepto para el sitio 10 (65,6) que fue *media*. La profundidad de las perforaciones en estos puntos varió de 37 a 86 m (Cuadro 4.1.) aunque no se encontró una correlación con los valores del ICA. Estos bajos datos del ICA se podrían explicar por los metales pesados encontrados en estas muestras de agua. En particular, Cd^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} han sido reportados como principales contaminantes en las aguas subterráneas (Auge, 2003, 2004; Galindo et al., 2002). Esta contaminación de metales pesados podría ser debida a restos de aplicaciones pasadas de agroquímicos, así como por la composición natural del suelo. Los valores del ICA revelaron una situación comprometida de la calidad del agua del acuífero en la zona de Pergamino,

especialmente en el caso de los sitios 2, 3 y 11 que fueron perforaciones usadas para suministro de agua potable. En cuanto a las ARS, sólo los puntos 12 y 20, utilizados para fines recreativos, tuvieron valores correspondientes a la categoría de *bueno*, con 81,1 y 84,3, respectivamente. El resto de las ARS presentaron una condición *mala* con valores que fueron desde 53,9 hasta 62,6. Estos bajos datos del ICA podrían deberse a una combinación de los múltiples factores que estarían superando los límites de regulación, tales como Fe^{2+} , EC, metales pesados, NO_3^{2-} , iones (Cuadro 4.2. y apéndice 4). Los más bajos se obtuvieron para las AUS 16, 17, 18 y 19 (60,4; 59,9; 63,2 y 62 respectivamente), todos ellos pertenecientes a la categoría *mala*. Estos resultados van en concordancia con el análisis de parámetros fisicoquímicos, donde se observaron valores altos en CE, Cl^- , Cr, Cd^{2+} y Fe^+ en casi todos los sitios de AUS. Aunque la mayoría de los valores del ICA de aguas superficiales cayeron en una categoría de calidad *mala*, los perfiles de parámetros fisicoquímicos son diferentes de acuerdo a que la contaminación generada sea por las actividades rurales o urbanas.

El análisis del ICA reveló una calidad en las aguas bastante pobre, aunque es posible que otros compuestos o la mezcla de ellos, que no son medidos, participen también del deterioro ambiental. Por esta razón se deberían incorporar otros instrumentos analíticos e integrados para completar la evaluación de la calidad del recurso hídrico.

4.3.4. Determinación de glifosato y AMPA

La presencia de estos dos compuestos ha sido detectada en los cuerpos de agua y en los suelos de todo el mundo, a pesar del hecho de que el glifosato tiene una vida media relativamente corta (Arunakumara et al., 2013; Coupé et al., 2012; Liu et al.,

1991; Lupi et al., 2015; Mamy et al., 2010). Ya que el cultivo predominante en la zona de estudio es la soja, se analizó la presencia de este herbicida y su metabolito, con el fin de evaluar una posible contaminación por agroquímicos. En todos los sitios de monitoreo, ambos productos fueron detectados en al menos uno de los meses monitoreados, indicando una descarga continua de estos compuestos en la cuenca, relacionado con la intensa actividad agrícola (Cuadro 4.2.)

En la fig. 4.8. se presenta el análisis del porcentaje de muestras con presencia de glifosato o AMPA solos y de ambos juntos, en cada grupo. Para el caso del herbicida se dieron proporciones similares tanto en ARS (38,9%) como en AUS (34,4%), con los valores mayores en ARSub (45,2%). Esto podría estar indicando un uso persistente de glifosato en la zona tal que supere la capacidad de metabolización del mismo en el ambiente y ocurra la percolación del producto. Las muestras positivas para AMPA solo variaron entre los grupos, encontrándose los valores más altos también en ARSub (20,5%); en ARS y AUS fueron de 14,8% y 6,3%, respectivamente. Esto podría explicarse por una alta capacidad de atenuación natural ejercida por la comunidad microbiana en la matriz subterránea que estaría degradando glifosato a AMPA, tal como se ha reportado en varios informes en otras partes del mundo (Arunakumara et al., 2013) así como en la región pampeana (Vera et al., 2010).

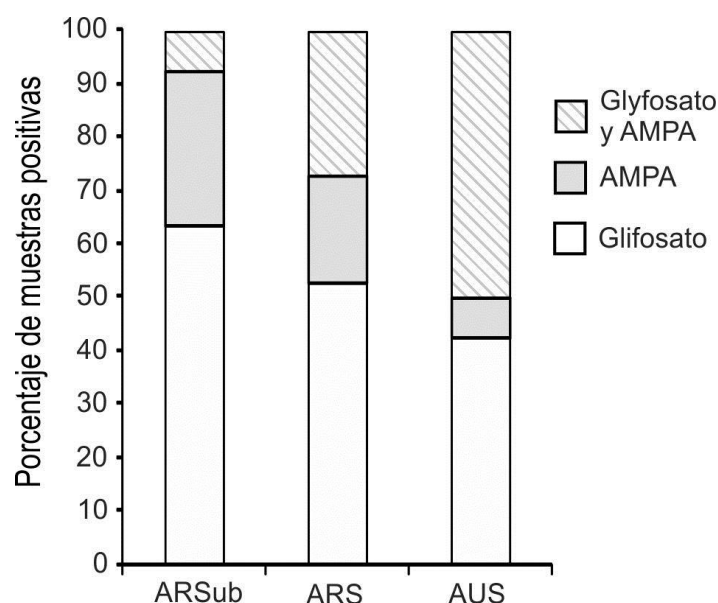


Figura 4.8. Porcentajes de muestras con presencia de glifosato, AMPA o ambos, para los tres grupos de muestras de agua (ARSub = aguas rurales subterráneas, n=64; ARS = aguas rurales superficiales, n=49 y AUS = aguas urbanas superficiales, n=28).

Las ARSub presentaron los porcentajes más bajos de coexistencia de ambos compuestos (5,5%), lo cual corresponde a un proceso de transformación eficiente del herbicida a su metabolito. Sin embargo en el caso de ARS y AUS estos porcentajes fueron hasta 4 y 8 veces mayor (20,4% y 40,6%, respectivamente). Esto nos puede sugerir que haya mecanismos de inhibición del proceso de biodegradación a causa de otros compuestos tóxicos presentes en los cuerpos de agua. También podría ser debido o a un proceso de concentración de AMPA (ya que tiene una vida media más larga) o a una mayor presencia de glifosato procedente de zonas rurales cercanas (no monitoreadas en este trabajo) o a una combinación de ambas circunstancias. De hecho, las precipitaciones ejercen un papel importante en la movilización de plaguicidas por un proceso de escorrentía tras la aplicación (Shipitalo & Owens, 2006). Coupé et al. (2012) observaron resultados similares, encontrando niveles altos del herbicida en agua de arroyos de zonas sojeras de Estados Unidos, en diferentes momentos de muestreo (antes y un mes después de la aplicación).

Con respecto a la concentración, se hicieron comparaciones entre grupos de agua y estacionales. Se encontraron valores más altos de glifosato en las muestras de superficie, ARS y AUS, comparadas con las ARSub ($p = 0,013$). Este resultado coincide con informes anteriores de la zona Quequen de la región pampeana que describen que, a pesar de lo relativamente corta que es la vida media del glifosato, este fue detectado en los suelos muestreados pre o post eventos de aplicación (Aparicio et al., 2013; Lupi et al., 2015). También en la zona de Arrecifes-Pergamino, otros autores reportaron niveles de glifosato en aguas superficiales aunque en valores mucho más altos que los aquí medidos, variando desde 0,10 hasta 0,70 mg L⁻¹, destacando que tras las aplicaciones, los eventos de lluvia aceleraban el transporte del herbicida hasta las aguas de arroyos circundantes (Peruzzo et al., 2008). Por otra parte, la comparación entre los valores de la mediana para los meses de primavera-verano (juntos) y de invierno resultó ser significativa ($p = 0,004$), encontrándose los más altos en el primer grupo con un rango de 0,18 a 6,8 µg L⁻¹ (datos no mostrados). La mayor concentración de glifosato se midió en el sitio 12 (29,8 µg L⁻¹) en febrero de 2015. Este valor excepcional podría quizá atribuirse a una descarga puntual del producto debido a un accidente o a malas prácticas agrícolas. Cabe recordar que las directrices de Calidad del Agua para la vida acuática del CCME establecen el límite máximo permisible para exposiciones a glifosato a corto y largo plazo en 2,7 y 0,8 mg L⁻¹, respectivamente (CCME, 2001; apéndice 4). Los resultados indicaron que las aguas superficiales de Pergamino no sobrepasaron ninguno de los dos niveles. Sin embargo, el hecho que se encontrara glifosato, podría implicar un riesgo para las especies acuáticas. En este sentido múltiples investigaciones han señalado la presencia de adyuvantes altamente tóxicos que contribuyen al daño causado a los organismos incluso a concentraciones muy bajas (Myers et al., 2016). Respecto al agua para consumo humano, de acuerdo con las directrices de la ley argentina sobre

residuos peligrosos (Ley 24051/92 para agua de bebida) para el Agua Potable que establece un límite de $0,28 \text{ mg L}^{-1}$ para la presencia de glifosato, ninguna de las muestras excedió este valor (ver cuadro 4.3.).

Sitios	Jul-2014	Ago-2014	Sept-2014	Oct-2014	Nov-2014	Dic-2014	Feb-2015
2	nd	0,177	nd	nd	0,641	3,523	0,125
3	0,199	1,306	nd	0,199	0,715	1,897	nd
11	0,200	1,617	nd	nd	0,346	2,119	nd

Cuadro 4.3. Niveles de glifosato en los sitios destinados a aguas para consumo ($\mu\text{g L}^{-1}$).

nd = no detectado. Se muestran las mediciones puntuales para cada sitio de muestreo entre los meses de julio de 2014 y febrero de 2015.

En cuanto a AMPA, la prueba de la mediana de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas entre los 3 grupos de muestras de agua ($p = 0,078$). En la comparación estacional (datos no mostrados), se encontró la mayor presencia en invierno ($p < 0,01$). Contrariamente al glifosato, para AMPA no hay una regulación que establezca los límites permisibles, a pesar de ser muy útil para identificar sitios potencialmente contaminados. Analizando los resultados de manera conjunta, se encontró mayor porcentaje de muestras con glifosato o con AMPA solos en ARSub; esto podría indicar que estén ocurriendo más eventos de aplicación que los que el ambiente puede degradar, lo cual hace que haya una mayor percolación hasta el acuífero. En el caso del metabolito, cabe aclarar que su presencia en aguas no es necesariamente una medida de la degradación del herbicida, ya que también puede venir de procesos como el escurrimiento o la erosión por el viento desde campos de cultivo adyacentes, visto que como ya se ha dicho es más persistente en suelos que el glifosato (Bento et al., 2017; Busse et al., 2001; Mamy et al., 2010; Ratcliff et al., 2006). Respecto a las concentraciones, el hecho de encontrar mayores niveles tanto de glifosato

como de AMPA en AUS, nos estaría confirmando que los compuestos químicos debe medirse y analizarse no sólo en los recursos hídricos de los campos de cultivo, sino también en las áreas urbanas cercanas a ellos. Especialmente porque la contaminación urbana podría inhibir de manera significativa la biodegradación y, en consecuencia, aumentar la contaminación del agua. El hecho de que se encuentre más glifosato en primavera-verano pero más concentración de su metabolito en invierno podría ser explicado por la alta persistencia del AMPA, que hace que pueda ser medido aún lejos en el tiempo de los eventos de aplicación (época estival). Si bien los niveles del herbicida no excedieron los marcados por la normativa vigente, podrían existir además otros compuestos o la mezcla de ellos que estén causando efectos tóxicos en la cuenca.

4.3.5. Bioensayo con *C. elegans* para la determinación de la calidad de aguas

Se estudió la aplicabilidad del protocolo del bioensayo con *C. elegans* para la determinación de la toxicidad de las aguas de la cuenca de Pergamino, incluyendo de esta manera otra herramienta para complementar la evaluación de su calidad.

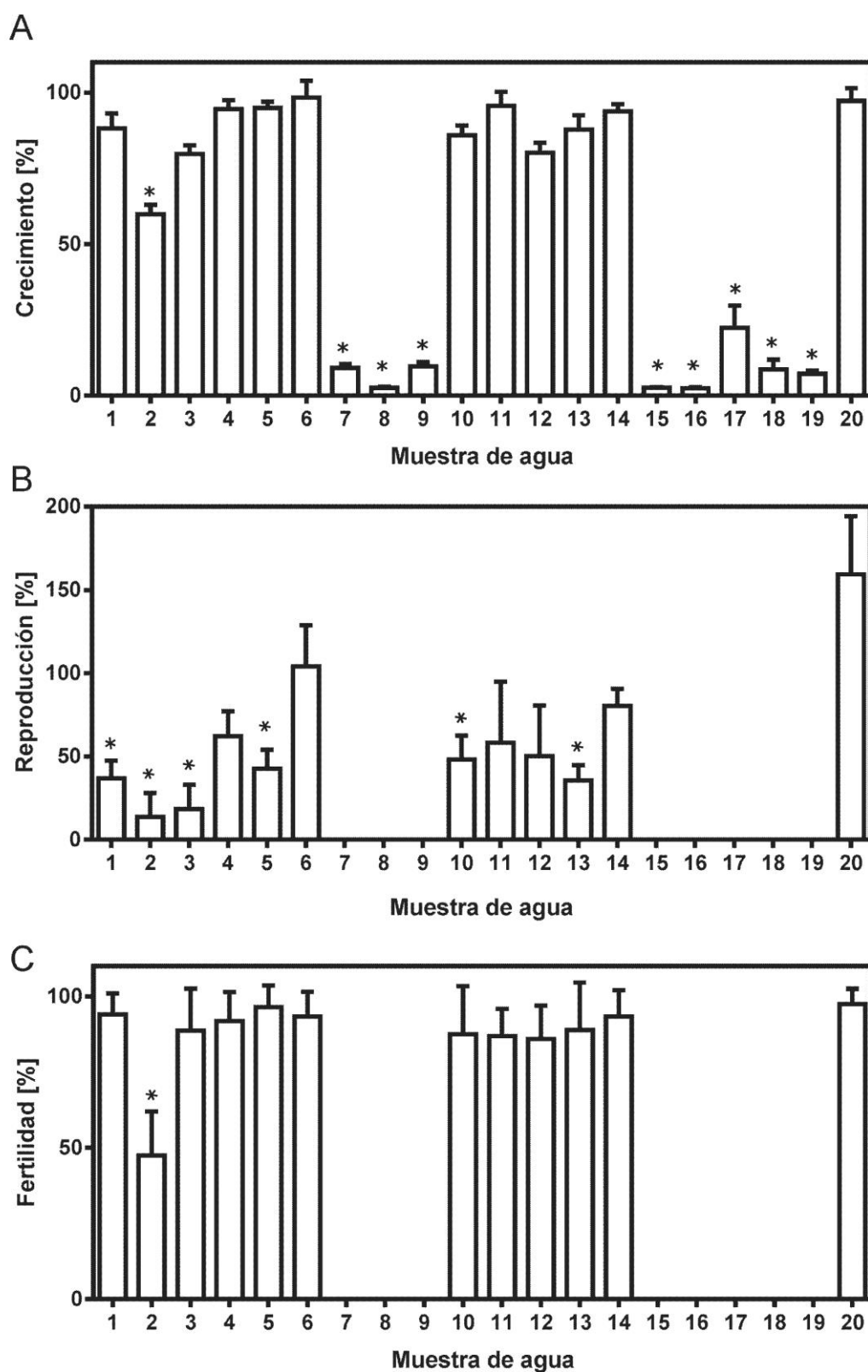


Figura 4.9. Crecimiento (A), reproducción (B) y fertilidad (C) de *C. elegans* tras la exposición. Los nematodos se expusieron a las muestras de agua y se determinaron las respuestas luego de 96 h de incubación a 20 °C. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes de 10 L1 cada uno; $n=40$. *diferencias significativas según ANAVA ($p<0.05$); * $p < 0,0001$.

En la Fig. 4.9. se presentan los resultados del bioensayo piloto con *C. elegans*, que se hizo para el mes de septiembre de 2013 (campaña de muestreo no incluida en el análisis presentado a continuación desde julio de 2014 y febrero de 2015). Según los resultados del test de Dunnett, tanto el valor de crecimiento, como reproducción y fertilidad dieron diferencias significativas en los sitios 2, 7 a 9 y 15 a 19 ($p < 0,0001$). La reproducción también se vio afectada en los sitios 1, 2, 3, 5, 10 y 13 ($p < 0,0001$). Un contexto similar se observó en las muestras 15 a 19, donde la inhibición de los tres parámetros fue cercana al 100%. En el sitio 2, hubo valores intermedios de crecimiento y fertilidad, mientras que en el sitio 20 los valores fueron mayores al control. Seguramente en este punto haya habido algún elemento o combinación de ellos que favoreciesen la multiplicación del nematodo.

Estos primeros resultados obtenidos revelaron variaciones entre las distintas muestras de agua, lo que dio una primera idea de la validez del uso del nematodo *C. elegans* como modelo toxicológico para determinar el impacto ambiental. En ese sentido, este experimento sirvió para definir que la exposición crónica afecta significativamente a los parámetros seleccionados, indicando que en los cuerpos de agua seleccionados exista algún tipo de tóxico que esté influyendo en el normal desarrollo del animal. En estos ensayos se obtuvo una respuesta similar con los tres parámetros (cuando se ve inhibido el crecimiento también se ven inhibidos los otros dos), así que se eligió el crecimiento relativo para el análisis completo de toda la campaña y determinación del estado de calidad de las aguas de la cuenca. Es importante destacar que es el crecimiento relativo uno de los parámetros usados en la normativa internacional ISO 10872:2010 (Höss et al., 2009; ISO, 2010) para evaluación en estudios toxicológicos.

Así pues, se realizó el bioensayo de crecimiento relativo con *C. elegans* para las 20 muestras de agua. En el cuadro 4.4. se presentan la media, la mediana, el mínimo y el máximo del conjunto de datos para los 7 meses de muestreo. Se llevó a cabo un análisis estadístico con el objeto de encontrar los parámetros que podrían ser responsables de la disminución en el crecimiento, estableciendo una posible correlación entre los resultados del análisis fisicoquímico y los del bioensayo. Los coeficientes de Spearman y Pearson revelaron una correlación positiva entre el crecimiento relativo del nematodo y la concentración de CO_3^{2-} (coeficiente de Spearman 0,249; $p < 0,05$), de Ca^{2+} (coeficiente de Pearson 0,204; $p < 0,05$), de Mn^{2+} (coeficiente de Spearman 0,253; $p < 0,05$) y de Fe^{2+} (coeficiente de Spearman 0,44; $p < 0,05$). Esto podría indicar que dichos parámetros estarían favoreciendo el crecimiento de los nematodos. Por el contrario, en el caso del Cd^{2+} se encontró una correlación negativa (coeficiente de Spearman -0,215; $p < 0,05$). Se detectaron concentraciones de Cd^{2+} por encima del límite de regulación para la protección de la vida acuática ($0,0002 \text{ mg L}^{-1}$). Además, algunas de las concentraciones encontradas para este metal estuvieron por encima del valor LOEC para el crecimiento de *C. elegans* ($0,14 \text{ mg mL}^{-1}$; Traunspurger et al., 1997). La disminución del crecimiento relativo podría haber sido afectada, en parte, por la presencia de este elemento; de hecho ha sido reportado que es un compuesto muy tóxico para los organismos (Barjhoux et al., 2012; Lavado et al., 2001, 2004; Moore & Ramamoorthy, 2012). En concreto para *C. elegans*, varios informes muestran que el Cd^{2+} disminuye el crecimiento, la longitud del ciclo, la reproducción y el comportamiento (Boyd et al., 2010; Chen et al. 2013; Dietrich et al., 2016; Höss et al. 2011; Hsu et al. 2012; Popham & Webster, 1979).

Con glifosato y AMPA se encontró una correlación negativa aunque las diferencias no fueron significativas (coeficiente de Pearson -0,074; $p = 0,4360$ y -0,146; $p = 0,1245$, respectivamente).

		ARSub									ARS								AUS			
		1	2	3	4	5	9	10	11	13	6	7	8	12	14	15	20	16	17	18	19	
<i>C. elegans</i>	Media	0,98	0,95	0,86	0,60	0,82	0,49	0,95	0,86	0,84	0,65	0,27	0,59	1,07	1,05	0,52	0,99	0,57	0,79	0,44	0,71	
	Mediana	1,03	0,93	1,02	1,04	0,81	0,71	0,93	0,90	0,90	0,99	0,84	1,00	1,13	1,09	0,64	1,09	0,88	1,11	0,74	1,05	
	DE	0,20	0,11	0,27	0,43	0,36	0,33	0,14	0,26	0,26	0,44	0,55	0,46	0,24	0,18	0,50	0,33	0,48	0,44	0,61	0,52	
	Min.	0,68	0,83	0,30	0,02	0,35	0,13	0,75	0,53	0,45	0,04	0,00	0,03	0,83	0,76	0,04	0,47	0,03	0,16	0,05	0,10	
	Max.	1,23	1,11	1,11	1,32	1,32	1,02	1,20	1,33	1,22	1,37	1,30	1,38	1,36	1,31	1,37	1,36	1,44	1,43	1,48	1,53	

Cuadro 4.4. Crecimiento relativo de *C. elegans* en muestras de agua de los diferentes sitios de la cuenca del río Pergamino. ARSub = aguas rurales subterráneas; ARS = aguas rurales superficiales; AUS = aguas urbanas superficiales. Para cada sitio, los parámetros estadísticos se calcularon a partir de un n = 7 (meses de muestreo).

En la fig. 4.10. se muestran los valores medios de crecimiento relativo, discriminando por tipo de agua y por estación climática (Fig. 4.10. A y B, respectivamente).

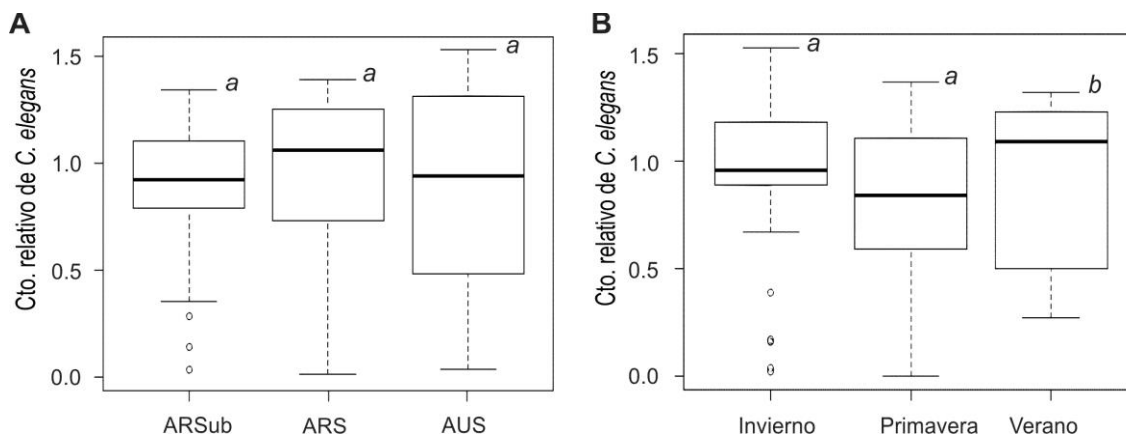


Figura 4.10. Valores medios de crecimiento relativo, representados en boxplots, para los grupos de muestras de agua (A) y por estaciones (B). Análisis ANAVA no paramétrico (Kruskal-Wallis). ARSub = aguas rurales subterráneas; ARS = aguas rurales superficiales; AUS = aguas urbanas superficiales. Para A el n=64 para ARSub; n=49 para ARS y n=28 para AUS. Para B el n= 40 en invierno y verano; n= 60 para primavera. Letras diferentes representan diferencias significativas (χ^2 ; $p < 0,05$).

La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas ($p = 0,44$) entre los grupos de muestras (ARSub, ARS y AUS). Sin embargo, cuando se comparó entre las estaciones del año, el crecimiento relativo aumentó significativamente en verano, en comparación con primavera y también al comparar con invierno ($p = 0,03255$). Esto podría ser debido a que en esta época de más lluvias haya mayor arrastre de elementos que, como ya se ha dicho, pudieran favorecer o acelerar el crecimiento del nematodo, tales como Ca^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{2+} u otros macro o micronutrientes que no hayan sido medidos y que puedan estar ejerciendo un efecto estimulador del crecimiento. Se sabe que son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis celular. De hecho, en *C. elegans* se ha demostrado que concentraciones altas de Mn^{2+} intracelular proporcionan protección contra el daño oxidativo favoreciendo la respuesta al estrés, además de prolongar el ciclo celular (Lin et al., 2006). En cuanto al Fe^{2+} y Ca^{2+} , varios informes

hablan de su implicancia en procesos biológicos esenciales para la vida, como la vía de la insulina, transporte de oxígeno, neurodesarrollo, así como su papel como cofactores de las enzimas involucradas en la síntesis de DNA y la producción de energía (Anderson & Leibold, 2014; Gourley et al., 2003; Tanimoto et al, 2017).

4.3.6. Categorización de efectos tóxicos

Los datos mostraron que todos los sitios de monitoreo pertenecen como mínimo a una de las tres categorías con efecto tóxico (*ligeramente tóxico*, *moderadamente tóxico* y *muy tóxico*) (Fig. 4.11.).

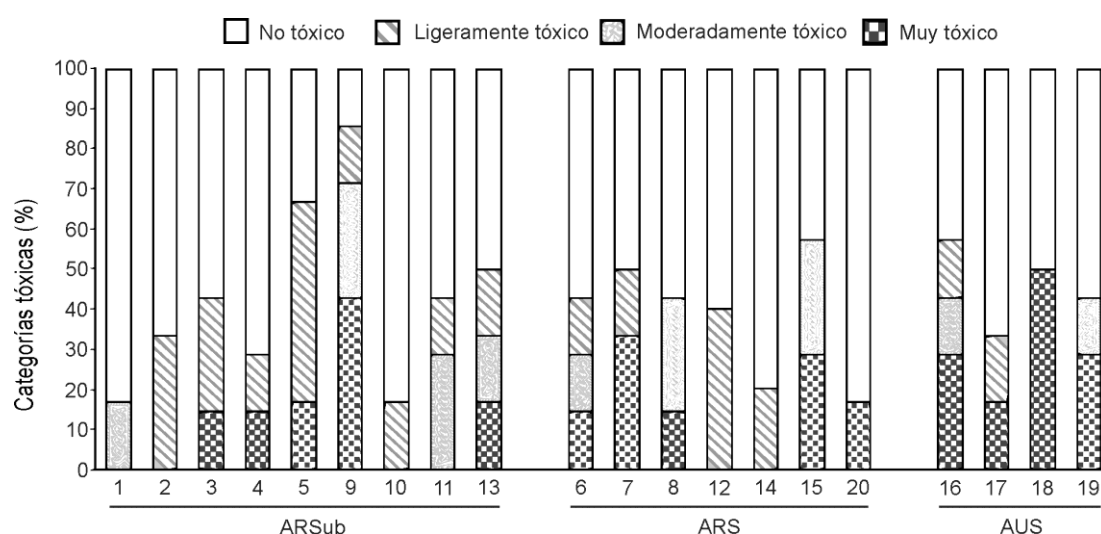


Figura. 4.11. Categorización de efectos tóxicos sobre el crecimiento relativo de *C. elegans* en las diferentes muestras de agua. Se presentan los porcentajes relativos de las diferentes categorías tóxicas para cada punto de muestreo de la cuenca de Pergamino. ARSub = aguas rurales subterráneas; ARS = aguas rurales superficiales; AUS = aguas urbanas superficiales. n=7 (meses de muestreo).

En la mayoría de las muestras se reveló una categoría de *muy tóxico* (porcentajes de 14,3 a 50) con la excepción de los sitios 1, 2, 10, 11, 12 y 14. Todos los puntos pertenecientes a AUS tuvieron porcentajes elevados para la categoría de *muy tóxico*, en

particular el 18 tuvo un 50%, que fue el más alto de la categorización. En cuanto a efecto *no tóxico*, los valores oscilaron desde 14,3 hasta 83,3%. Particularmente en 1 (83,3%), 10 (83,3%), 14 (80%) y 20 (83,3%) se dieron los más altos. De hecho, el porcentaje de la categoría de *no tóxico* en las muestras de agua a lo largo de los ríos Botija y Pergamino fue de alrededor del 50%. Las ARSub presentaron diferentes escenarios con respecto al bioensayo de toxicidad de *C. elegans*, con múltiples combinaciones de las cuatro categorías. Precisamente este grupo incluyó la condición menos contaminada que fue para el sitio 1 (16,7% *ligeramente tóxico* y 83,3% *no tóxico*) y también la más contaminada, en el sitio 9 (42,9% *muy tóxico*, 28,6% *moderadamente tóxico*, 14,3% *ligeramente tóxico* y 14,3% *no tóxico*). Esta variabilidad en las ARSub podría ser debida a diversos factores que influyen en la complejidad del sistema del acuífero.

Respecto a las ARS, los dos sitios en los que se encontraron los mayores porcentajes de efecto *no tóxico* fueron el 14 con un 80% y el 20 con un 83,3%; en ellos se dieron también los valores de crecimiento relativo más altos, seguramente relacionado con un mejor estado del agua. Por otro lado, comparando estos resultados con los del ICA, no hubo una correlación significativa ($p=0,735$; $p < 0,05$). Esto pone de manifiesto que no sólo los compuestos desconocidos en las muestras sino también la compleja interacción dentro de ellas podrían ser responsables de los efectos tóxicos (Aguirre et al., 2009; Thuong et al., 2013). Y en este sentido, este análisis confirmó que *C. elegans* es útil para identificar potenciales amenazas para la vida acuática y para la salud humana en la cuenca de Pergamino.

4.4. Conclusiones

La cuenca del río Pergamino fue seleccionada por ser un área representativa para estudiar tanto el efecto de la intensificación en la producción de soja como el aumento de las actividades urbanas que afectan a las fuentes de aguas superficiales y subterráneas. Este trabajo refuerza el concepto de que existe un impacto antrópico, así como de la agricultura y del desarrollo urbano, sobre la calidad del agua y esto debe ser evaluado desde un punto de vista holístico. Los análisis llevados a cabo en este capítulo y la interrelación entre ellos es un acercamiento a esa idea.

La caracterización hidrogeoquímica de las aguas mostró que la composición de las mismas es predominantemente sodio-potasio bicarbonatadas. En particular, el grupo de ARS mostró una distribución más heterogénea que va desde altamente sodio-potasio bicarbonatadas hacia sodio cloradas. Los parámetros fisicoquímicos tales como: pH, T°C, CE, NO_3^- , SO_4^{2-} , Na^+ , Cl^- , Fe^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} mostraron diferencias significativas entre los tres grupos de agua y a lo largo del año. Estos resultados demuestran que las condiciones de la cuenca del río Pergamino son extremadamente dinámicas. Por otra parte, es importante mencionar que algunos parámetros exceden los límites regulatorios para diversos usos del agua (riego, protección de la vida acuática, agua potable). Por este motivo y con el objetivo de obtener una visión integrada de la calidad hídrica de la cuenca, se utilizaron los parámetros fisicoquímicos para la construcción de un ICA, que reveló que en la mayoría de los sitios de monitoreo la categoría es *mala*, lo que indica que toda la zona presenta una situación ambiental frágil y comprometida. Este deterioro podría estar asociado con diferentes fuentes de contaminación, como la percolación y escorrentía de agroquímicos hacia las aguas subterráneas (con una posible

contaminación de la napa freática) en las zonas rurales y los vertidos urbanos en el área urbana.

Además de esto, la contaminación por glifosato y AMPA se detectó a lo largo del año predominantemente en las aguas superficiales en comparación con las subterráneas, con valores más altos en la estación cálida coincidente con la campaña de cosecha de soja. La presencia simultánea de ambos compuestos podría indicar un proceso de alta degradación o incluso una aplicación frecuente y continua de glifosato en el ambiente. Además de sentar un precedente de conocimiento relativo a la contaminación ambiental por el uso del plaguicida aplicado en el país, posibilitará el diseño y elección de aquellos manejos que minimicen los riesgos ambientales.

Particularmente los sitios de monitoreo que son utilizados para agua de bebida constituyen una mayor preocupación. En estos sitios, la concentración de NO_3^- superó el límite de regulación para agua potable, lo cual representa una importante amenaza para la salud humana.

Del análisis estadístico realizado para establecer una correlación entre el análisis fisicoquímico y la disminución en el crecimiento de *C. elegans* se encontró una correlación negativa entre el Cd^{2+} y los resultados del bioensayo. De hecho, se detectaron concentraciones de Cd^{2+} por encima del límite de regulación para la protección de la vida acuática ($2 \mu\text{g L}^{-1}$). No se encontró una correlación significativa, entre los resultados del bioensayo y los niveles de glifosato y AMPA. La categorización de la magnitud de efectos tóxicos sobre el crecimiento de *C. elegans* ha demostrado ser una herramienta útil para interpretar las diferentes intensidades en la respuesta biológica. Se detectaron efectos toxicológicos en los tres grupos de agua y, a pesar de que los sitios de monitoreo muestran una gran variación a lo largo del año en la respuesta del crecimiento relativo del nematodo, todos ellos pertenecen a una de las tres

categorías (*ligeramente tóxico, moderadamente tóxico o muy tóxico*) al menos una vez durante el período de monitoreo. Esta respuesta dada por *C. elegans* fue particularmente útil para detectar la toxicidad incluso cuando los parámetros del agua cumplen los requisitos reglamentarios de la normativa vigente y la calidad parece ser la adecuada.

CAPÍTULO 5.

***Caenorhabditis elegans* COMO HERRAMIENTA INTEGRADA PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y TOXICIDAD EN UNA CUENCA DE RÍO DE LA PROVINCIA DE MENDOZA**

Capítulo 5. *Caenorhabditis elegans* como herramienta integrada para la evaluación de la calidad y toxicidad en una cuenca de río de la provincia de Mendoza

5.1. Introducción

Para hacer frente a la creciente demanda de agua para el desarrollo de la agricultura y la industria, así como también de las comunidades y centros urbanos, es necesario desarrollar políticas de gestión de recursos hídricos que sean sostenibles a largo plazo y que aseguren una distribución equitativa del agua a todos los sectores involucrados. Hoy en día existe el consenso en todo el mundo que la planificación y la gestión de los recursos hídricos tienen que ser un concepto integrado que incluye no sólo la cantidad y calidad del agua, sino también la distribución de la misma, el uso y los servicios ecológicos (Oliveira et al., 2007). Por esta razón, en las últimas décadas se ha optado por llevar a cabo evaluaciones integradas de la calidad del agua que incorporen no solo un monitoreo clásico de los cursos de agua (como herramienta poderosa para proporcionar información confiable) sino también determinaciones ecológicas y toxicológicas. Esta evaluación integral del estado del recurso hídrico y de los riesgos asociados a su contaminación, es fundamental para prevenir los daños en el ambiente, proteger la biodiversidad, la salud de la población y el desarrollo socioeconómico. Sin embargo, a veces los medios logísticos, técnicos y económicos son limitados e imposibilitan llevar a cabo las determinaciones de contaminantes a gran escala o numerosos ensayos ecotoxicológicos.

Las actividades humanas no sólo utilizan los recursos de agua reduciendo el caudal disponible, sino que también descargan sustancias químicas y bacteriológicas. En

consecuencia, las actividades antropógenas son una de las amenazas más importantes para la conservación de los recursos hídricos. Los ríos en particular son sistemas dinámicos que muestran una gran variabilidad en la calidad del agua, tanto temporal como espacial. Aunque gran parte de la misma se debe a las características intrínsecas del sistema, podría ser también causada por eventos de contaminación antrópica (Mophin-Kani & Murugesan, 2014). La cuenca del río Tunuyán (Provincia de Mendoza, Argentina) ha sido seleccionada como un sistema tradicional de monitoreo de agua representativo y susceptible para probar la aplicabilidad del bioensayo toxicológico con *C. elegans*, con la idea de hacer una evaluación integrada de la calidad del agua. A pesar de los esfuerzos realizados en la provincia de Mendoza para evaluar la situación hídrica actual, aún falta integrar la calidad toxicológica de los cursos de agua en aras de obtener una medida de riesgo para el ambiente y la salud de la población (Lemos, 2008).

5.1.1. Selección de la zona de estudio

La provincia de Mendoza fue seleccionada debido a su alta vulnerabilidad: se encuentra en una de las regiones más secas en la parte occidental de la Argentina que tiene una de las mayores zonas de riego del país. La elección de esta zona radica en que constituye un caso emblemático en el uso eficiente de los recursos hídricos, pues el agua es escasa y su distribución y uso afecta el desarrollo socio-económico (Chambouleyron et al., 2002). La superficie de la provincia de Mendoza es de 148 827 km² y posee la mayor área irrigada del país, representando el 25% del total nacional. El suministro de agua proviene de los cinco ríos que dan origen a cuatro unidades o cuencas hidrogeológicas: la de los ríos Mendoza y Tunuyán Inferior (*Cuenca Norte*), río

Tunuyán Superior (*Cuenca Centro o Valle de Uco*), ríos Diamante y Atuel (*Cuenca Sur*) y Malargüe (Hernández & Martinis, 2013).

Los ríos de estas cuencas dan origen a los llamados *oasis* productivos que son zonas de aporte de agua suficiente que permiten un desarrollo de áreas cultivadas bajo riego. Constituyen el elemento básico de organización del espacio provincial y de desarrollo socio económico, ocupando alrededor del 4% del territorio. Los más importantes son el *oasis* norte (conformado por los ríos Mendoza y Tunuyán inferior) que alberga al Gran Mendoza con más de 1 millón de habitantes, y *oasis* centro (Río Tunuyán superior) que corresponde a la región conocida como Valle de Uco. En este sector se genera aproximadamente el 90% del agua que llega a las zonas urbanas e irrigadas (Miner Vega, 2011; Pitte et al., 2009). Los cursos de agua tienen un régimen nival, es decir que presentan mayores caudales en verano producto del aumento de las temperaturas y el consecuente derretimiento de los mantos nivosos y de los glaciares. Los menores caudales se presentan en invierno, coincidente con bajos (casi nulos) requerimientos de agua por parte de los cultivos, situación aprovechada para el corte de agua en los canales y para su mantenimiento. El caudal promedio del río Tunuyán es de $30,6 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. Las precipitaciones en forma de lluvia que se producen en las partes altas de las cuencas tienen poca influencia sobre los caudales. El río Tunuyán se encuentra dividido en dos subcuencas, la superior (ubicada en el Valle de Uco), con una superficie de 54000 ha y la inferior 81000 ha con derechos de riego, respectivamente.

Los sitios de monitoreo en la cuenca del río Tunuyán fueron seleccionados en trabajos previos y abarcan las dos subcuencas (Morábito et al., 2011, 2012a; Salatino et al., 2014). Fueron escogidos teniendo en cuenta su proximidad a las áreas de desarrollo productivo y urbanas, donde la calidad del agua se ve amenazada tanto por actividades agrícolas como por efluentes urbanos e industriales (Morábito et al., 2011; Salatino et

al., 2014). En los tramos inferiores del río Tunuyán, de donde se obtiene agua para regadío, se ha visto una tendencia progresiva de aumento de la salinización del agua, además de un importante incremento de la contaminación acuática que compromete la productividad del suelo y los rendimientos de la actividad agrícola con importantes pérdidas económicas (Neamtu et al., 2009). La zona alta del río Tunuyán superior ha experimentado en los últimos años un desarrollo masivo de la agricultura producto de la radicación de importantes empresas locales y extranjeras. Por tanto, el deterioro de la calidad del agua visto en los tramos inferiores, se origina río arriba coincidiendo con los *oasis* de mayor actividad industrial, producción agrícola y desarrollo urbano mencionados (Laviè, 2009; Morábito et al., 2005, 2008, 2011).

Se seleccionaron siete puntos georreferenciados: el río Las Tunas (LT), arroyo Aguanda (A), arroyo Yaucha (Y), presa Valle de Uco (VU), Costa Anzorena (CA), Tiburcio Benegas (TB) y canal San Martín (SM) (Fig.5.1. y cuadro 5.1).

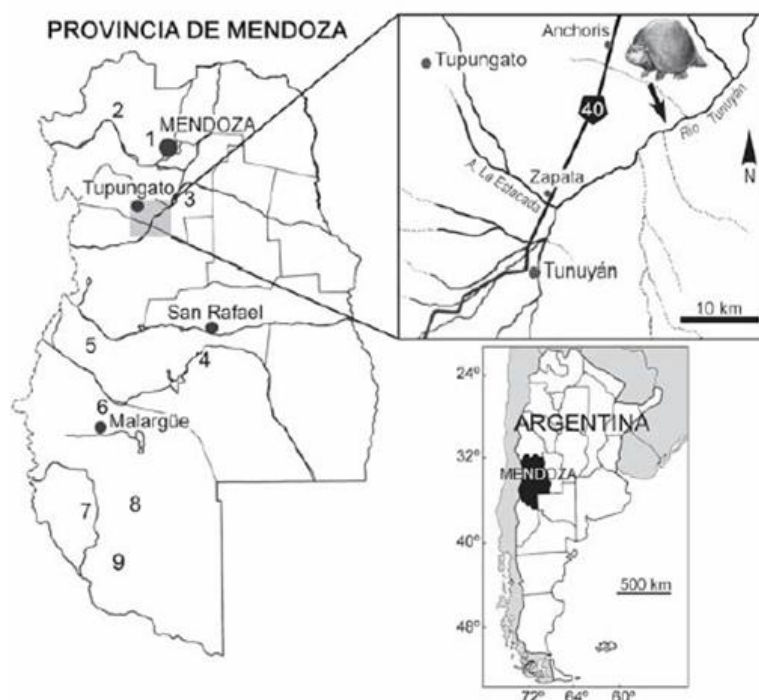




Figura 5.1. Área de estudio y sitios de monitoreo en la cuenca del río Tunuyán.

El sitio LT se encuentra en el área menos desarrollada aunque en la última década la demanda de agua se incrementó debido a la creación de nuevos viñedos. La subcuenca superior (que incluye LT, A, Y y VU) comprende aproximadamente 54000 ha cultivadas (viñedos y frutales) donde se realizan tratamientos para el control de plagas. Por ley, en esta área sólo puede ser utilizado el 17% del caudal del río (DGI, 1996). El resto del flujo se utiliza con fines productivos aguas abajo del dique El Carrizal (360 hm^3) que separa las dos subcuencas y que fue construido para múltiples usos, tales como la generación de energía, riego, recreación y deportes acuáticos. Por otra parte, aguas debajo de CA, se desarrollan diferentes actividades urbanas, cría de ganado, actividades agrícolas e industriales. TB se encuentra aguas abajo del dique y discurre a lo largo del departamento de San Martín, donde se encuentra localizado el sitio de monitoreo del canal SM. Este último ha sido seleccionado por tener gran

impacto de desarrollo urbano y de viñedos (esta actividad consume una gran cantidad de agua de la subcuenca inferior del río Tunuyán) (Cuadro 5.1).

Código	Sitios	Localización	Altitud	Características
LT	Arroyo Las Tunas	S: 24° 68 m; O: 63° 04 m	1606 m	Arroyos tributarios a VU. Representan el 20% del caudal total. Intensa actividad agrícola, vinicultura mayormente.
A	Río tributario Aguanda	S: 24° 88 m; O: 62° 12 m	1546 m	
Y	Arroyo Yaucha	S: 24° 86 m; O: 62° 32 m	1300 m	
VU	Valle de Uco	S: 24° 79 m; O: 62° 64 m	1130 m	Cabecera del río. Representa el 80% del caudal total. Intensa actividad agrícola, vinicultura mayormente.
CA	Dique Costa Anzorena	S: 25° 01 m; O: 62° 93 m	848 m	Contaminación urbana, agrícola e industrial.
TB	Dique Tiburcio Benegas	S: 25° 30 m; O: 63° 22 m	728 m	Aguas abajo del dique
SM	Canal San Martín	S: 25° 55 m; O: 63° 35 m	657 m	Contaminación urbana y agrícola

Cuadro 5.1. Localización, coordenadas y características de los sitios seleccionados en la cuenca del Tunuyán. La coordenadas X e Y están localizadas dentro del marco de referencia geodésico nacional denominado Posgard 94.

5.2. Objetivos

El objetivo principal de esta parte de la investigación fue caracterizar las diferentes calidades espacio-temporales y las condiciones toxicológicas del agua a lo largo de la cuenca del río Tunuyán (Mendoza).

Los objetivos específicos fueron:

1. Caracterización de las muestras de aguas a través del análisis de parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos.
2. Cálculo de un ICA donde se integran estos parámetros, representativos de agua para riego.
3. Valorar la idoneidad del bioensayo toxicológico con *C. elegans* como herramienta útil para complementar los monitoreos clásicos de agua, considerando las condiciones ambientales y actividades antropogénicas asociadas al uso del agua (como agricultura, industrias y centros urbanos).
4. Análisis estadístico conjunto del bioensayo con *C. elegans* y del ICA calculado para la evaluación de la sensibilidad y fiabilidad del bioensayo.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Análisis de parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos

En los Cuadros 5.2. y 5.3. se muestran la media, la mediana, el mínimo y el máximo, del conjunto de parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos, de los 8 meses monitoreados. Se puede observar que los datos abarcaron un amplio rango de valores entre los sitios de las subcuencas superior e inferior con variaciones en las características fisicoquímicas y bacteriológicas.

Respecto al pH medido, no se encontró ninguna variación significativa ni a lo largo del río ni entre las estaciones del año, con valores comprendidos entre 6,5 y a la 7,9 ($p = 0,49$ en ambos casos). Sin embargo, se detectó un fuerte aumento en la salinidad (expresado como CE), así como en la concentración de SO_4^{2-} tanto en VU,

CA, TB como en SM, en comparación con A, Y y LT ($p < 0,01$) (Cuadro 5.1.). De hecho, estas diferencias se observaron a lo largo del seguimiento anual (en todos los meses). En SM se encontraron valores tres veces más altos que en los sitios de la subcuenca superior (A, Y y LT). Las mediciones de CE superaron el límite máximo permisible ($900 \mu\text{S cm}^{-1}$) en VU, CA, TB y SM, a pesar que todos los sitios estaban por debajo del límite máximo tolerable ($1800 \mu\text{S cm}^{-1}$). Varios informes indican que el aumento del uso para riego de las aguas subterráneas (con alta CE) en la subcuenca superior del Tunuyán y su consiguiente escorrentía, podrían ser los responsables de la salinización de la subcuenca inferior; mientras que la alta concentración de SO_4^{2-} en la subcuenca inferior podría deberse a la composición natural del suelo en la zona (Chambouleyron et al., 1993; Laviè et al., 2008). En el caso de PO_4^{3-} , se detectaron durante el mes de mayo y en todos los sitios de monitoreo, valores superiores a los límites de regulación ($0,4 \text{ mg L}^{-1}$) (DGI, 1996). Esta alta concentración podría explicarse por una disminución del flujo durante la toma de muestras en los meses de otoño e invierno. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de SO_4^{2-} en VU, CA, TB y SM, en comparación con A, Y y LT ni tampoco entre los meses del año ($p = 0,23$).

Sitio		T°C	Q m ³ s ⁻¹	pH	CE μS cm ⁻¹	RAS	HCO ₃ ⁻ mg L ⁻¹	SO ₄ ⁻ mg L ⁻¹	NO ₃ ⁻ mg L ⁻¹	PO ₄ ³⁻ mg L ⁻¹	P mg L ⁻¹	DQO mg L ⁻¹	OD mg L ⁻¹	Cl ⁻ mg L ⁻¹	Na ⁺ mg L ⁻¹	K ⁺ mg L ⁻¹	Ca ²⁺ mg L ⁻¹	Mg ²⁺ mg L ⁻¹
Aguanda (A)	Media	14,8	0,83	7,29	403,8	0,59	90,00	126,00	1,55	0,43	0,14	26,00	7,30	27,96	19,18	3,46	57,00	13,80
	Mediana	16,3	0,77	7,31	400,0	0,63	103,73	129,60	1,33	0,38	0,12	18,00	7,40	26,63	20,70	2,93	56,00	12,00
	DE	3,9	0,15	0,37	37,3	0,15	29,49	25,24	0,53	0,18	0,06	29,59	0,38	4,00	4,73	2,67	4,90	5,70
	Min	7,0	0,72	6,60	350,0	0,26	36,61	91,20	0,89	0,24	0,08	2,00	6,80	24,85	9,20	1,56	50,00	7,20
	Max	19,0	1,14	7,83	481,0	0,78	115,94	158,40	2,66	0,73	0,24	76,00	7,60	35,50	25,30	9,75	64,00	24,00
Yaucha (Y)	Media	13,8	1,83	7,32	245,5	0,63	110,60	25,20	1,94	1,03	0,33	15,67	7,66	25,29	15,61	1,80	37,00	6,00
	Mediana	14,8	1,73	7,50	245,0	0,73	122,04	21,60	1,77	0,82	0,22	6,00	7,80	24,85	18,40	1,56	36,00	4,80
	DE	3,6	0,50	0,48	26,0	0,23	29,07	23,48	0,88	0,84	0,28	18,50	0,48	5,51	5,79	1,43	4,00	4,21
	Min	6,0	1,41	6,50	190,0	0,26	61,02	0,00	0,89	0,29	0,10	4,00	6,90	17,75	6,90	0,78	32,00	1,20
	Max	18,0	3,03	7,86	270,0	0,86	134,24	72,00	3,54	2,42	0,79	37,0	8,10	31,95	20,70	5,07	42,00	12,00
Las Tunas (LT)	Media	12,2	1,23	7,26	532,6	0,45	55,68	210,00	2,44	0,42	0,13	6,25	7,96	31,95	17,11	2,58	62,50	27,90
	Mediana	12,0	1,19	7,29	520,5	0,44	42,71	213,60	1,77	0,22	0,07	7,00	7,60	31,95	17,25	2,54	64,00	25,80
	DE	3,3	0,50	0,28	48,8	0,12	25,98	33,53	1,34	0,48	0,16	3,10	1,29	5,02	4,82	0,69	6,74	6,53
	Min	7,0	0,31	6,80	480,0	0,23	30,51	139,20	1,33	0,13	0,04	2,00	6,10	24,85	9,20	1,95	50,00	20,40
	Max	17,0	2,10	7,72	600,0	0,61	97,63	254,40	5,32	1,47	0,48	9,00	10,10	39,05	25,30	3,90	70,00	37,20

Continúa en la página siguiente

Sitio		T°C	Q m ³ s ⁻¹	pH	CE μS cm ⁻¹	RAS	HCO ₃ ³⁻ mg L ⁻¹	SO ₄ ⁻ mg L ⁻¹	NO ₃ ⁻ mg L ⁻¹	PO ₄ ³⁻ mg L ⁻¹	P mg L ⁻¹	DQO mg L ⁻¹	OD mg L ⁻¹	Cl ⁻ mg L ⁻¹	Na ⁺ mg L ⁻¹	K ⁺ mg L ⁻¹	Ca ²⁺ mg L ⁻¹	Mg ²⁺ mg L ⁻¹
Valle de Uco (VU)	Media	10,9	6,81	7,21	1231,3	1,22	125,85	327,60	2,23	0,64	0,21	20,00	8,53	158,86	65,55	4,83	176,00	22,95
	Mediana	12,0	6,73	7,17	1285,0	1,13	109,84	319,20	2,22	0,58	0,19	25,50	9,30	143,78	60,95	3,51	176,00	18,00
	DE	2,1	1,84	0,34	177,6	0,41	71,23	104,59	0,84	0,51	0,17	12,03	1,05	48,96	24,65	2,59	17,27	11,25
	Min	6,0	4,23	6,70	980,0	0,61	42,71	134,40	0,89	0,00	0,00	2,00	6,90	110,05	32,20	2,73	156,00	12,00
	Max	12,0	9,33	7,78	1470,0	1,86	280,69	513,60	3,54	1,74	0,57	27,0	9,40	230,75	101,20	9,75	196,00	39,60
Costa Anzorena (CA)	Media	13,6	15,30	7,22	1371,3	1,24	183,82	393,00	1,61	0,65	0,22	26,25	7,64	144,22	69,98	8,53	190,75	31,05
	Mediana	14,0	13,89	7,16	1395,0	1,23	186,11	357,60	1,55	0,36	0,12	16,50	7,60	142,00	67,85	7,80	184,00	29,40
	DE	2,6	3,10	0,32	149,7	0,40	68,37	82,04	0,62	0,69	0,23	21,90	1,13	18,87	22,05	2,07	25,45	11,48
	Min	8,0	12,84	6,90	1160,0	0,61	54,92	321,60	0,89	0,15	0,05	13,00	5,90	117,15	34,50	5,85	156,00	15,60
	Max	16,0	22,13	7,74	1560,0	1,90	280,69	532,80	2,66	2,29	0,75	59,0	9,00	170,40	98,90	11,70	232,00	45,60
Tiburcio Benegas (TB)	Media	14,9	39,49	7,26	1380,1	1,23	157,89	429,00	1,44	0,37	0,12	12,75	7,18	147,33	69,26	7,85	192,00	36,00
	Mediana	15,5	40,25	7,27	1385,0	1,14	164,75	408,00	1,55	0,35	0,11	13,00	7,15	152,65	62,33	7,80	190,00	25,20
	DE	4,2	11,88	0,33	143,9	0,40	46,52	74,18	1,18	0,23	0,07	7,85	1,09	17,70	20,55	3,99	11,86	28,52
	Min	8,0	24,50	6,70	1230,0	0,56	67,12	355,20	0	0	0	5,00	6,00	120,70	39,10	3,90	180,00	14,40
	Max	20,0	52,00	7,69	1660,0	1,80	231,88	585,60	3,54	0,76	0,25	20,0	8,30	166,85	98,90	16,77	216,00	103,20

Continúa en la página siguiente

Sitio		T°C	Q	pH	CE	RAS	HCO ₃ ⁻	SO ₄ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	P	DQO	OD	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
			m ³ s ⁻¹		μS cm ⁻¹		mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
San Martín (SM)	Media	15,9	1,56	7,21	1341,7	1,24	169,98	417,60	1,84	0,56	0,15	14,80	7,46	139,46	69,99	7,41	199,14	30,17
	Mediana	16,5	1,38	7,28	1350,0	1,23	170,86	412,80	1,77	0,40	0,13	10,00	7,10	156,20	64,40	7,80	200,00	22,80
	DE	3,6	0,27	0,32	157,5	0,42	31,59	53,31	0,65	0,39	0,07	14,18	1,02	34,52	22,20	2,53	14,69	24,46
	Min	8,5	1,33	6,80	1140,0	0,58	140,35	355,20	0,89	0,21	0,07	4,00	6,70	71,00	39,10	3,90	180,00	12,00
	Max	19,0	2,00	7,69	1550,0	1,80	231,88	513,60	2,66	1,33	0,26	38,00	9,20	166,85	98,21	11,70	222,00	84,00

Cuadro 5.2. Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua de la cuenca del Tunuyán.. Para cada sitio se calcularon los parámetros estadísticos se calcularon a partir de un n=8 (meses de muestreo). Q= caudal; CE= conductividad eléctrica; RAS= tasa de absorción de sodio; P= Fósforo total; DQO= demanda química de oxígeno; OD= oxígeno disuelto; DE= Desviación estándar; Min= mínimo valor; Max= máximo valor. Se presentan los bicarbonatos que son los predominantes en el balance iónico, aunque los carbonatos fueron también considerados.

Se analizaron también otros parámetros iónicos tales como Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , K^+ y NO_3^- no encontrándose ninguna diferencia significativa ni entre los sitios de monitoreo ni entre los períodos estacionales ($p > 0,1$) (Cuadro 5.1.). Cuando estas concentraciones de iones se compararon entre los dos grupos VU, CA, TB y SM por un lado y A, Y y LT por otro, se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$), con la excepción de NO_3^- ($p > 0,1$). Tanto los valores de NO_3^- como de Cl^- fueron menores a los límites de regulación de aguas para riego de Mendoza (concentración máxima tolerable de 45 mg L^{-1} para NO_3^- y 400 mg L^{-1} para Cl^- ; DGI, 1996). Las mediciones más altas de DQO fueron encontradas en A, VU y CA, especialmente durante la temporada de primavera; lo que puede apuntar a la contaminación orgánica debido a un aumento en las actividades recreativas y ganaderas (Salatino et al., 2014). La DQO disminuyó río abajo mostrando una pequeña recuperación en el punto TB que se mantuvo en SM. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas ni entre los sitios de muestreo ni a lo largo del año ($p > 0,1$ para ambos casos).

El análisis de los parámetros bacteriológicos reveló una fluctuación de los valores a lo largo del año con un fuerte incremento durante noviembre y diciembre. En este sentido, la media y la mediana en el caso de la medición de BAM difirieron en un orden de magnitud en A, Y, LT y TB (Cuadro 5.3.).

Sitio		BAM	CT	CTT
		(UFC mL ⁻¹)	(NMP 100mL ⁻¹)	(NMP 100mL ⁻¹)
Aguanda (A)	Media	1,58E+04	7,75E+02	1,15E+02
	Mediana	3,35E+03	2,30E+02	4,00E+01
	DE	3,42E+04	1,55E+03	1,44E+02
	Min	4,50E+02	4,00E+01	3,00E+01
	Max	1,00E+05	4,60E+03	4,30E+02
Yaucha (Y)	Media	2,47E+04	6,31E+02	6,18E+02
	Mediana	1,85E+03	5,50E+01	4,00E+01
	DE	6,28E+04	1,60E+03	1,61E+03
	Min	1,30E+02	3,00E+01	3,00E+01
	Max	1,80E+05	4,60E+03	4,60E+03
Las Tunas (LT)	Media	2,34E+03	7,63E+01	3,88E+01
	Mediana	1,26E+02	5,50E+01	3,50E+01
	DE	5,56E+03	6,55E+01	1,36E+01
	Min	2,00E+01	3,00E+01	3,00E+01
	Max	1,60E+04	2,30E+02	7,00E+01
Valle de Uco (VU)	Media	3,52E+03	8,75E+01	4,88E+01
	Mediana	1,65E+03	4,00E+01	3,50E+01
	DE	3,89E+03	7,80E+01	4,12E+01
	Min	2,00E+01	3,00E+01	3,00E+01
	Max	9,30E+03	2,30E+02	1,50E+02

Continúa en la página siguiente

Sitio		BAM	CT	CTT
		(UFC mL ⁻¹)	(NMP 100mL ⁻¹)	(NMP 100mL ⁻¹)
Costa Anzorena (CA)	Media	7,99E+04	5,67E+03	3,77E+03
	Mediana	1,20E+04	2,40E+03	6,80E+02
	DE	1,12E+05	7,94E+03	8,22E+03
	Min	1,00E+03	2,10E+02	7,00E+01
	Max	3,00E+05	2,40E+04	2,40E+04
Tiburcio Benegas (TB)	Media	1,53E+04	3,15E+03	3,03E+03
	Mediana	1,60E+03	4,00E+01	3,00E+01
	DE	2,84E+04	8,43E+03	8,47E+03
	Min	3,10E+02	3,00E+01	3,00E+01
	Max	8,00E+04	2,40E+04	2,40E+04
San Martín (SM)	Media	6,58E+03	1,21E+03	3,84E+02
	Mediana	1,85E+03	4,00E+02	3,00E+02
	DE	1,20E+04	1,52E+03	3,11E+02
	Min	7,80E+02	2,30E+02	7,00E+01
	Max	3,10E+04	4,30E+03	9,00E+02

Cuadro 5.3. Parámetros bacteriológicos de las muestras de agua de la cuenca del Tunuyán. Para cada sitio se calcularon los parámetros estadísticos a partir de un n=8 (meses de muestreo). Q= caudal; BAM= bacterias aerobias mesófilas; CT= coliformes totales; CTT= coliformes termotolerantes; DE= Desviación estándar; Min= mínimo valor; Max= máximo valor; UFC= Unidades Formadoras de Colonias; NMP= Número Más Probable; E = notación exponencial; multiplica al número anterior por 10 elevado a la enésima potencia (indicada seguidamente).

Cuando se compararon los datos de BAM de A, Y, LT y TB con el grupo VU, CA y SM se detectó una diferencia moderada ($p < 0,01$). Los valores más bajos de parámetros bacteriológicos (BAM, CT y CTT) se encontraron en A, Y LT mientras que las mayores concentraciones fueron medidas en CA y TB. El aumento de la concentración bacteriana podría explicarse no sólo por los efluentes domésticos, sino

también por el arrastre de residuos provenientes de la ganadería, debido a la escorrentía consecuencia del deshielo y las lluvias.

Como ya se ha mencionado, a partir de los resultados obtenidos en los monitoreos se vió que algunos de los parámetros presentaron mayor concentración durante ciertos periodos del año, que nos habla de una variación en la calidad de agua. Se graficaron los parámetros en los que se vieron estos cambios espacio-temporales significativos (Fig. 5.2.). Para ello se agruparon, por un lado, los datos correspondientes a los meses de otoño e invierno (O-I) y, por el otro, a primavera y verano (P-V). Se presentan en boxplots los análisis realizados para los parámetros $T^{\circ}\text{C}$ ($p = 0,0003$), RAS ($p = 0,0127$), Na^+ ($p = 0,0301$) y log BAM ($p = 0,0061$).

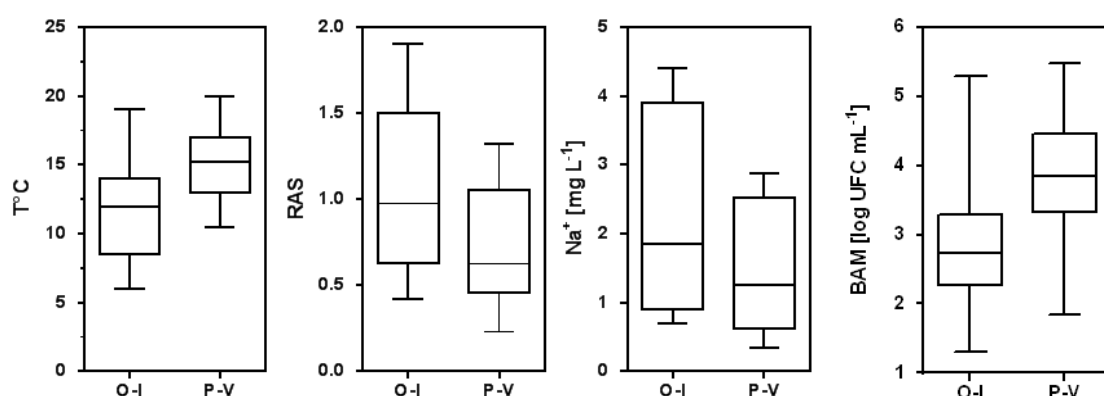


Figura 5.2. Representación en boxplots del análisis no paramétrico de Mann-Whitney. Se representan en gráficos boxplots la $T^{\circ}\text{C}$ = temperatura; RAS= Relación de Absorción de Sodio; Na^+ y BAM= bacterias aerobias mesófilas (UFC= Unidades Formadoras de Colonias), analizados por estación: otoño-invierno (O-I) y primavera-verano (P-V). $n=28$ para cada estación.

Los valores más altos de RAS y Na^+ encontrados en los meses estivales, están directamente relacionados con el proceso de salinización de las aguas en la subcuenca inferior del Tunuyán, como ya se ha mencionado (Chambouleyron et al., 1993; Laviè et

al., 2008). Los valores de BAM son mayores en la época estival respecto al invierno debido a la mayor frecuencia de deshielo y lluvias propias de esos meses.

Los datos generados mostraron una variación espacio-temporal en la calidad del agua en el río Tunuyán que pudiera ser dependiente de las actividades antrópicas. Por lo tanto, la aplicación de una herramienta integrada que pueda sintetizar todos estos resultados fisicoquímicos y bacteriológicos sería útil para un mejor entendimiento del estado de la calidad del agua.

5.3.2. Cálculo del ICA

La fig. 5.3. muestra los datos del ICA para los diferentes sitios. El valor más alto correspondió a LT (91) seguido de A e Y con 86,4 y 86, respectivamente. Los tres pertenecen a una categoría *buena* de calidad de agua. Si bien VU forma parte geográficamente de la subcuenca superior, su valor del ICA fue de 74,2, que está dentro la categoría *media*. Una posible explicación es que en VU hay cinco parámetros que exceden los límites legales permitidos según la DGI, tres más (SO_4^{2-} , RAS y CE) que los puntos TB, A e Y (Salatino et al., 2014). Probablemente debido a eventos de contaminación difusa, ya que en esta zona hay actividad agrícola y también recreativa. Los valores de ICA junto con el análisis de los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos vistos hasta ahora, describen que la subcuenca superior tiene una mejor calidad del agua, con excepción del punto VU.

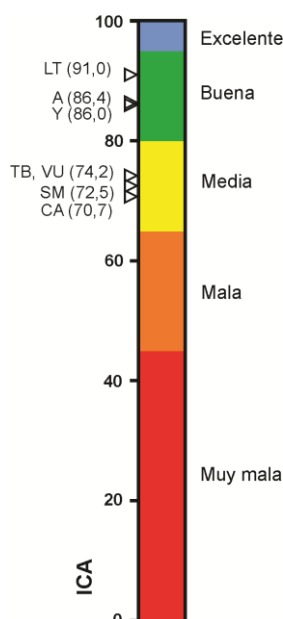


Figura 5.3. Datos del ICA para los diferentes sitios de monitoreo de la cuenca del río Tunuyán; n=8.

En la subcuenca inferior, los valores del ICA fueron 70,7, 74,2 y 72,5 para CA, TB y SM, respectivamente (categoría *media*). Esta pequeña fluctuación en la calidad del agua desde CA a TB podría ser debido a una mejora puntual de la misma, después de la salida del curso de agua del embalse El Carrizal. Una vez obtenidos los valores del ICA, fueron comparados entre ellos, agrupando tanto por subcuencas como por estaciones (Fig. 5.4.). Los resultados indicaron una clara diferencia entre las subcuencas (Test de Mann-Whitney $p = 0,0003$) (Fig. 5.4.). Se vio también una marcada desemejanza estacional y este notable efecto toxicológico durante los meses cálidos, va en consonancia con observaciones anteriores en la zona, que muestran que durante ese periodo la calidad del agua disminuye debido al intenso uso recreativo y agrícola (Laviè et al., 2008; Morábito et al., 2012b).

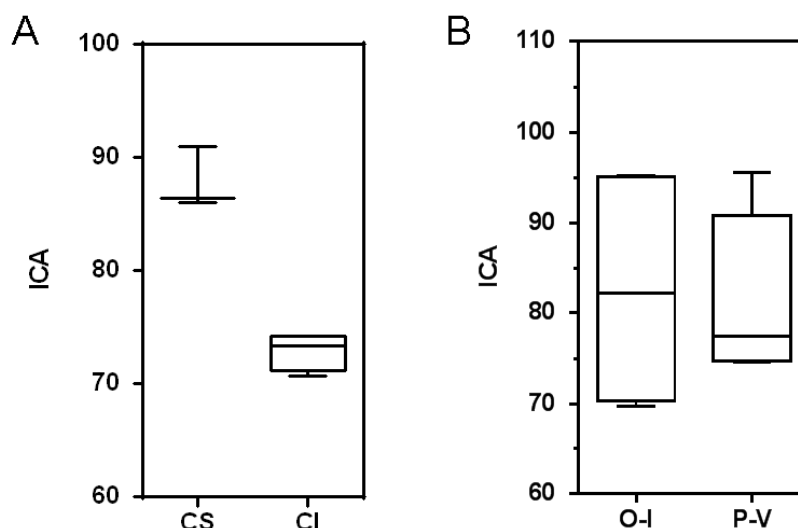


Figura 5.4. Análisis no paramétrico (Test de Mann-Whitney $p = 0,0003$) de los valores del ICA por subcuencas (A); $n=3$ para CS (subcuenca superior) y $n= 4$ para CI (subcuenca inferior) y por estaciones: otoño e invierno (O-I) *versus* primavera y verano (P-V) (B); $n=4$ para cada estación.

A pesar de que todos los datos del ICA describen condiciones aceptables de calidad, existe un claro deterioro aguas abajo. Esta situación es la que indica que se requieren estudios adicionales para evaluar el impacto real sobre el ecosistema.

5.3.3. Bioensayo con *C. elegans* para la determinación de la calidad de aguas

Con objeto de obtener una evaluación integrada de la calidad del agua del río Tunuyán, se realizó el bioensayo de crecimiento relativo de *C. elegans*. Los valores de la mediana mostraron una pequeña disminución en comparación con el control en los sitios A (0,86), Y (0,90) y LT (0,74). Los datos más bajos se midieron en los otros sitios de monitoreo: 0,65; 0,74; 0,63 y 0,70 para VU, CA, TB y SM, respectivamente. El box-plot en la Fig. 5.5. muestra los valores de la mediana para cada punto de control. El análisis estadístico reveló diferencias significativas en las muestras de agua de los puntos de monitoreo ($p < 0,01$).

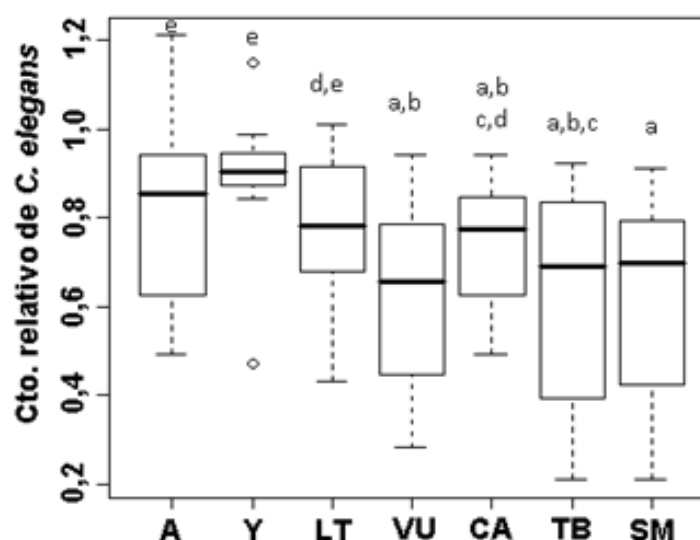


Figura 5.5. Crecimiento relativo de *C. elegans* a lo largo de los sitios de monitoreo. Se realizó un análisis ANAVA no paramétrico. Se representa la dispersión de los grupos de datos mediante boxplots. Los sitios con la misma letra no presentan diferencias en base al test *t-Student* ($p < 0,05$); $n=8$.

Estas comparaciones indicaron que los crecimientos relativos en A e Y fueron mayores a los de CA, TB, SM y VU; mientras que en LT el valor medio fue significativamente mayor al compararlo con VU, TB y SM. Este análisis estadístico refuerza la conclusión de que la calidad del agua en la subcuenca superior es mejor que en la inferior. El punto VU resultó tener más similitud con los sitios de monitoreo de la subcuenca inferior, a pesar de pertenecer a la superior. Este resultado coincidió con el análisis del ICA. A pesar de que el sitio LT presentó el valor más alto del ICA (91, categoría *buena*), el ensayo con *C. elegans* dio un valor de 0,74, lo que indica que hubo un efecto tóxico, seguramente debido a sustancias que no están siendo determinadas en el ICA.

En la Fig. 5.6.A se muestran los valores medios del bioensayo, agrupados por subcuencas. Se vió una clara diferencia entre ambas. La superior permitió un mayor crecimiento relativo del nematodo, lo cual va en concordancia con los resultados

obtenidos hasta ahora en este trabajo, que indican una mejor calidad de la misma respecto a la subcuenca inferior. En la Fig. 5.6.B, el análisis de los valores medios del bioensayo en otoño-invierno y en primavera-verano, mostró claras diferencias estacionales.

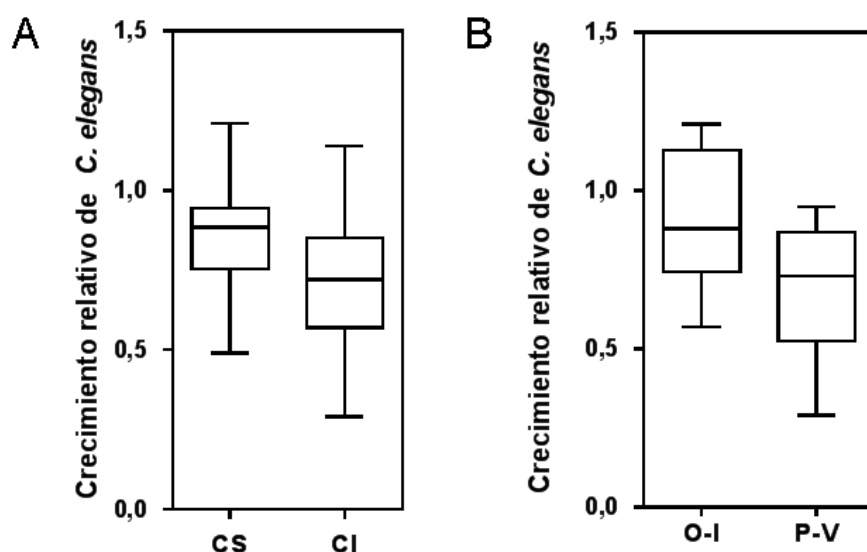


Figura 5.6. Análisis no paramétrico (Test de Mann-Whitney $p = 0,0003$) de los valores de crecimiento relativo de *C. elegans* analizados por subcuencas (A); $n=24$ para CS (subcuenca superior); $n=32$ para CI (subcuenca inferior) y por estaciones: otoño e invierno (O-I) versus primavera y verano (P-V) (B); $n=32$ para cada una.

La diferencia de crecimiento, sugiere que no siempre los valores de los ICA clásicos son suficientes para evaluar la calidad del agua o para proteger a los organismos acuáticos: es necesaria la realización de ensayos toxicológicos adicionales para obtener una evaluación integrada y más realista del estado de las aguas.

En la Fig. 5.7. se comparó la mediana del crecimiento relativo de *C. elegans* de los diferentes meses de muestreo. El test de Friedman ($p = 0,0003$) bloqueado por meses reveló un valor más bajo en noviembre (0,49) y diciembre (0,43), sugiriendo que la toxicidad es mayor en esa época. En el resto de los meses, los datos medios fueron de entre 0,68 y 0,94 sin diferencias significativas entre ellos. Estos resultados son acordes a

los revelados por el ICA y a los encontrados en estudios anteriores en la zona, que remarcan que en la época estival la calidad del agua disminuye debido al intenso uso recreativo y agrícola, además de la escorrentía por el deshielo y las lluvias (Laviè et al., 2008; Morábito et al., 2012b).

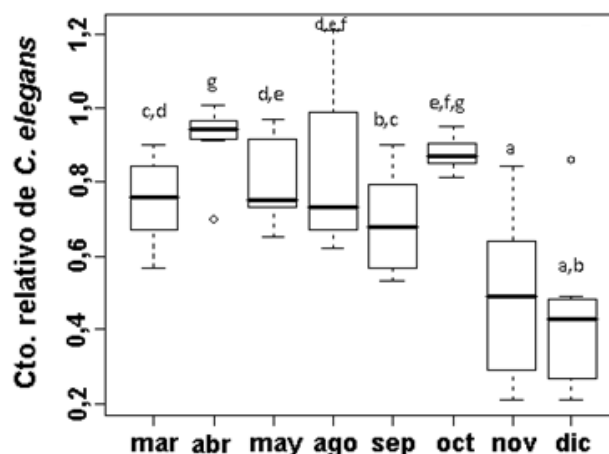


Figura 5.7. Crecimiento relativo de *C. elegans* en los diferentes meses de monitoreo. Se realizó un análisis ANAVA no paramétrico. Se representa la dispersión de los grupos de datos mediante boxplots. Los meses con la misma letra no presentan diferencias en base al test *t-Student* ($p < 0,05$); $n=7$.

Estos resultados subrayan que el bioensayo de crecimiento de *C. elegans*, junto con el análisis tradicional de calidad del agua, es una herramienta valiosa para evaluar los efectos toxicológicos a fin de estimar las amenazas ambientales sobre el recurso.

5.3.4. ACP

Para un estudio más exhaustivo de la relación entre el crecimiento relativo de *C. elegans*, los parámetros fisicoquímicos y los bacteriológicos, se realizó un ACP. En la Fig. 5.8. se puede observar que los dos primeros componentes explicaron el 62% de la varianza total y diferenciaron dos grupos distintos en el CP1: uno con valores positivos

en los sitios A, Y LT, y otro con negativos en VU, CA, TB y SM. En el área superior derecha del gráfico, el sitio Y presentó los valores más altos, seguidos por A y LT. Por el contrario, VU exhibió características similares a la subcuenca inferior (CA, TB y SM).

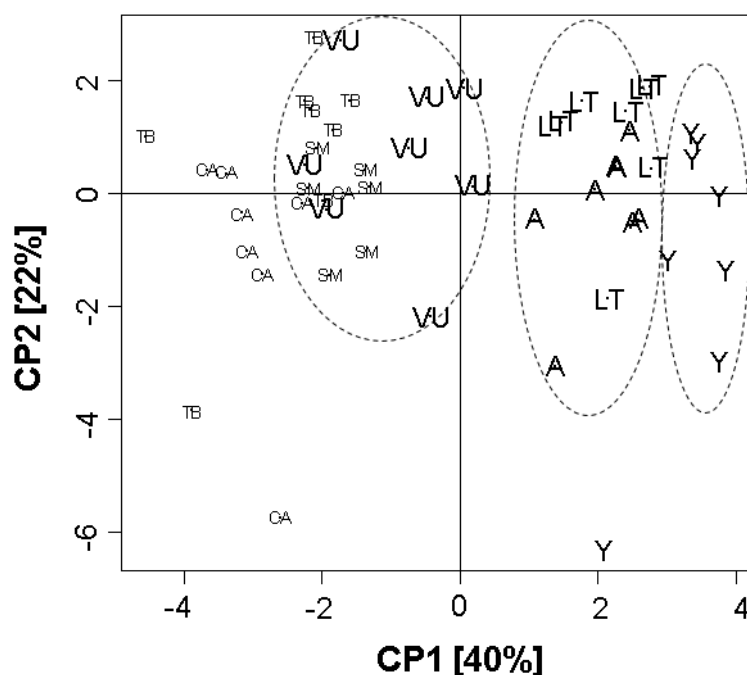


Figura 5.8. Representación del ACP de los sitios de monitoreo según el crecimiento relativo de *C. elegans* y los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos.

En el cuadro 5.4. se indican los autovectores de los componentes del ACP. Los coeficientes de las variables de los autovectores del componente 1 revelaron que el crecimiento (coeficiente positivo) se contrapone a todas las otras variables (coeficientes negativos). Con la excepción de NO_3^- , PO_4^{3-} y P con valores de coeficientes positivos pequeños, que no dominan en el CP1. Los componentes 2° y 3° no tienen interpretación física inmediata.

Variable	CP1	CP2	CP3
logQ	-0.309	0.006	0.038
logCl	-0.373	0.093	-0.010
logNa	-0.344	0.064	-0.219
logK	-0.336	-0.047	0.164
logCa	-0.383	0.078	-0.058
logMg	-0.272	0.199	0.269
logCO3H	-0.247	0.134	-0.040
logSO4	-0.345	0.083	-0.020
lognitratos	0.096	0.250	0.414
logfosfatos	0.053	-0.465	0.167
logfosforo	0.052	-0.468	0.203
logBAM	-0.170	-0.338	0.311
Log col_tot	-0.170	-0.377	-0.306
log col_fec	-0.172	-0.367	-0.349
Crec.	0.178	0.162	-0.541

Cuadro 5.4. Autovectores del ACP.

Los resultados del ACP muestran que el extremo positivo (Y) refleja tres posibles combinaciones: un alto crecimiento relativo de *C. elegans*, bajos valores de parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos, o una combinación de ambos. En contraste, los grupos con valores más bajos del CP1 expresarían o un bajo crecimiento relativo de *C. elegans*, o valores altos en los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos, o una combinación de ambos.

Los sitios A, LT e Y son pequeños ríos de valle sin grandes asentamientos urbanos y con una moderada actividad agraria en la zona, con leve efecto sobre la calidad del agua. Por el contrario, los sitios VU, CA, TB y SM son ríos de mayor caudal, con mayor número de industrias, actividades agrícolas y de recreo en la zona, con un mayor impacto (Chambouleyron et al., 2002; Hernández & Martinis, 2013; Laviè et al., 2017). Estos resultados dan la evidencia que confirmaría las diferencias en la calidad del agua entre las subcuencas del río Tunuyán debido a la composición fisicoquímica y al crecimiento de *C. elegans*. Lo interesante entonces, es saber qué porcentaje de esas diferencias son debidas a la variabilidad medida en los parámetros fisicoquímicos y cuales a las diferencias en los datos del bioensayo.

5.3.5. Modelo linear multivariado y regresión simple del crecimiento relativo versus el ICA

Se calcularon tres modelos lineales teniendo en cuenta al crecimiento relativo como variable dependiente. En el primero, nominado como modelo completo, se utilizaron todas las variables como regresoras ($T^{\circ}C$, caudal, pH, CE, RAS, Cl^{-} , Na^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^{-} , SO_4^{2-} , NO_3^{-} , PO_4^{3-} , P, BAM, CT, CTT). El segundo (modelo reducido) sólo incluyó las variables usadas para el cálculo del ICA ($T^{\circ}C$, pH, RAS, Cl^{-} , Na^{2+} , HCO_3^{-} , SO_4^{2-} , NO_3^{-} , PO_4^{3-} , CT, CTT). El tercero se construyó teniendo en cuenta las siguientes variables regresoras: $T^{\circ}C$, pH, CE, K^{+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^{-} , PO_4^{3-} , BAM, CTT. Este último es el modelo óptimo dado que tuvo el mayor valor de R^2 ajustado. En el cuadro 5.5. se muestra el porcentaje de R^2 y R^2 ajustado de los tres. El modelo reducido tuvo los valores más bajos de ambos, 40,5 y 24,9 respectivamente. El completo, tuvo un R^2 ajustado de 42,1%. El óptimo sin embargo, presentó el R^2

ajustado más alto con un 51,2%. Ninguno mostró un R^2 mayor al 61,8%, lo que significa que hay una variabilidad de casi un 38% en los datos de crecimiento relativo de *C. elegans* que no está siendo explicada por los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos.

Modelo	R^2 (%)	R^2_{aj} (%)
Completo	61,8	42,1
Reducido	40,5	24,9
Óptimo	60,4	51,2

Cuadro 5.5. Diferentes modelos lineales considerando al crecimiento relativo de *C. elegans* como variable dependiente.

A pesar de que este estudio indica que el crecimiento de *C. elegans* se ve afectado por otras sustancias que alteran la calidad del agua y que no están siendo medidas, desafortunadamente no hay disponibilidad en la bibliografía de estudios previos que midieran otros compuestos en el río Tunuyán. Solo Fernández et al. (2003) compiló los agroquímicos utilizados en la cuenca del río Mendoza. Dado que ambas cuencas, la del río Tunuyán y la del río Mendoza comparten características geográficas y actividades antropogénicas similares, se podría pensar que exista la posibilidad de encontrar fertilizantes y pesticidas en los cursos de agua.

Otros autores (Salatino et al., 2009) identificaron metales pesados tales como Ar, Zn, Cr, Cd, Pl, Cu a lo largo de los ríos Tunuyán y Mendoza. Las concentraciones medidas en este trabajo fueron comparadas con los límites establecidos en las regulaciones (DGI, 1996; EPAS, 2001) para la calidad del agua de riego, encontrando que el Cu y Cd estuvieron por encima de lo permisible ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$ y $0,01 \text{ mg L}^{-1}$,

respectivamente) en los sitios LT y VU en particular. Tanto Cu como Cd han sido detectados en productos tales como antiparasitarios y fertilizantes, por lo que la presencia en el agua de río no es sorprendente y deberían llevarse a cabo controles rutinarios de supervisión. En resumen, los ríos de Mendoza están expuestos a diferentes contaminantes que podrían comprometer la calidad del agua y que no se miden en los monitoreos tradicionales y controles rutinarios.

El análisis de regresión lineal mostró una asociación lineal débil ($R^2 = 0,1409$) entre el ICA y los valores de crecimiento relativo. En la figura 5.9. se muestra la gran dispersión de los datos del crecimiento relativo de *C. elegans* para cada valor del ICA. Esto podría ser debido a que para cada uno de los siete datos del ICA (uno para cada punto de control) había ocho valores mensuales de crecimiento relativo de *C. elegans*; también podría explicarse porque los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos utilizados para el cálculo de este índice solamente explican el 24,9% de la variación del crecimiento del nematodo (R^2 ajustado del modelo lineal; cuadro 5.5.). Además, como se mostró en la Fig. 5.5., los valores de crecimiento relativo de *C. elegans* presentan importantes diferencias estacionales que generaron también dispersión en los datos.

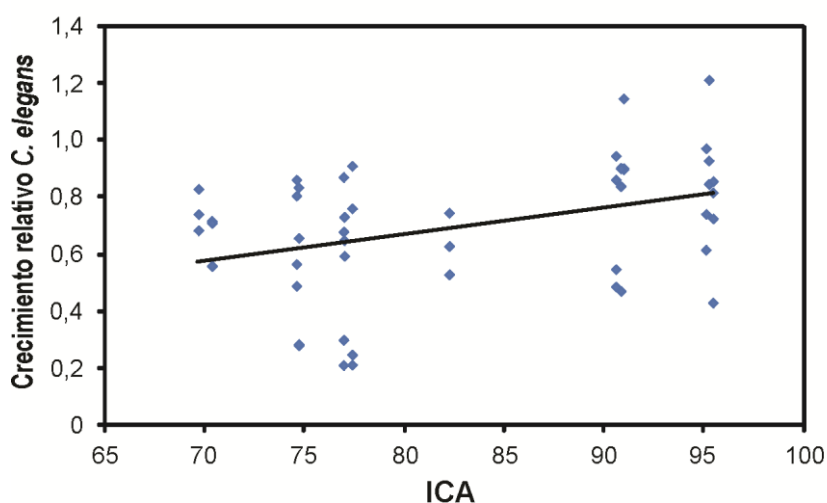


Figura 5.9. Análisis de regresión entre el crecimiento relativo de *C. elegans* y los valores del ICA.

Se refuerza de nuevo la idea de que hay sustancias químicas que alteran la calidad del agua y que no estarían siendo medidas en los monitoreos de rutina, cuyo efecto tóxico si podría ser revelado mediante el uso del bioensayo de crecimiento con *C. elegans*.

5.4. Conclusiones

Una de las observaciones más importantes de este estudio es que el crecimiento de *C. elegans* se ve afectado por los cambios en la calidad del agua, incluso cuando las muestras de agua cumplen los requisitos regulatorios. Los ríos de Mendoza están expuestos a diferentes contaminantes que comprometen el recurso hídrico y que no se miden en los monitoreos tradicionales y controles rutinarios. Este aspecto refuerza el concepto de que debe haber otros productos químicos que no se pudieron detectar *a priori*, pero que aun así ejercen efectos toxicológicos de peso. Se pone de relieve la idea que la buena calidad del agua (la que reflejan los ICA) no está necesariamente vinculada a su condición toxicológica, cosa que sí se obtiene con la respuesta de *C. elegans*. Estos resultados subrayan la necesidad de incluir bioensayos ecotoxicológicos en los monitoreos de rutina para evaluar los efectos de múltiples factores de estrés en los ecosistemas (CMNUCC, 2014). Hasta el momento, *C. elegans* parece ser un organismo sensible para esta evaluación (Cesnaitis et al., 2014; Hägerbäumer et al., 2015; Höss & Weltje, 2007; Höss et al., 2013); de hecho el crecimiento relativo puede ser un parámetro adecuado para detectar la interacción de contaminantes ambientales en muestras de agua que sería imposible con métodos tradicionales, especialmente en países con escasos recursos económicos donde se dificulta el llevar a cabo análisis analíticos para una amplia gama de contaminantes y sus interacciones.

CAPÍTULO 6.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Capítulo 6. Conclusiones generales y perspectivas futuras

La determinación de la calidad del agua tradicionalmente se ha realizado a partir de los valores obtenidos de diferentes parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos, contrastados con la legislación local vigente. Sin embargo, estos índices no son suficientes para evaluar la complejidad de las interacciones entre los contaminantes y en consecuencia es necesario realizar ensayos que permitan una evaluación integral del agua.

La caracterización y medición de tóxicos ambientales de manera individual no es suficiente para asegurar la ausencia de efectos indeseables, puesto que tanto la mezcla de sustancias como las posibles transformaciones que puedan darse en el ambiente, pueden modificar su efecto nocivo. De ahí que el uso de ensayos biológicos esté siendo considerado cada vez con mayor intensidad para la evaluación de la toxicidad global de los mismos.

Los bioensayos constituyen una herramienta eficaz para la obtención de efectos observables de la toxicidad de compuestos y sus interacciones, que no se logra mediante la analítica clásica. De esta manera se pueden identificar situaciones de riesgo a nivel de poblaciones, comunidades o ecosistemas. Los ensayos de toxicidad que se han venido usando hasta ahora en aguas, han permitido hacer una evaluación primaria pero los datos eran difícilmente extrapolables a un organismo superior tal y como es el ser humano. El aporte fundamental y novedoso de esta tesis es, por un lado la validación de un bioensayo que complementa a los análisis tradicionales de agua, cubriendo la falta de información sobre la calidad toxicológica de las mismas. Para ello se ha usado un modelo multicelular cuyo genoma guarda una gran similitud con el humano, estimándose un 70-80% de homología génica y en muchos casos también funcional.

Por otro lado, proporciona información integrada de datos fisicoquímicos, bacteriológicos y toxicológicos; que responden a la demanda de información de una población cada vez más consciente y preocupada por el posible impacto de contaminantes, conocidos o no, sobre el ambiente y la salud humana.

En una primera parte de esta tesis, se analizaron los efectos de la exposición a un formulado comercial de glifosato. Se analizó la respuesta *in vitro* de *C. elegans* tras la exposición a diferentes concentraciones del mismo, obteniendo la CE50 para el crecimiento, la reproducción y la fertilidad (1,058 mg mL⁻¹; 0,827 mg mL⁻¹ y 0,850 mg mL⁻¹, respectivamente). Los resultados demostraron que estas variables de *C. elegans* fueron inhibidas tras el tratamiento de manera concentración-dependiente. Los datos obtenidos fueron similares a los reportados previamente por Cole et al. (2004) que demostraron una correlación significativa entre el orden de toxicidad de la CE50 calculada en *C. elegans* y la de ratas y ratones para compuestos organofosforados, entre ellos el glifosato. Cabe destacar que *C. elegans* mostró más sensibilidad al compuesto que otros organismos como *Daphnia magna* y *Vibrio fischeri* (Sihtmäe et al., 2013). Así pues en este trabajo de tesis se concluye que *C. elegans* es sensible a formulaciones comerciales de glifosato y que la CE50 es comparable con la respuesta dada hasta ahora en modelos de mamíferos.

Se demostró también que la inhibición del crecimiento, reproducción y fertilidad de *C. elegans* tras el tratamiento con glifosato podría estar relacionada, en parte, con la generación de estrés oxidativo ya que se dió un incremento de la expresión de los genes de respuesta al mismo. Esto también fue un punto novedoso de este trabajo ya que la escasa literatura disponible sobre los efectos del estrés oxidativo provocado por glifosato comercial (Roundup®) tiene que ver con exposiciones agudas. La exposición crónica al herbicida confirmó la existencia de un desbalance redox por acumulación de

ERO. Se observó un aumento significativo en la expresión de genes de catalasa y consecuentemente también de su actividad. Estos hallazgos vienen a cubrir un hueco en la información sobre el posible mecanismo molecular intracelular de la toxicidad del glifosato en organismos no blanco. Además, para investigar en más detalle la inducción de estos genes se decidió hacer un análisis específico de su actividad con un experimento dosis respuesta con los 3 genes que en *C. elegans* codifican para la catalasa (ctl-1, ctl-2 y ctl-3) tras la exposición a diferentes concentraciones del formulado. Se obtuvo que ctl-1 y ctl-3 fueron inducidos hasta 3 y 2 veces sobre el control, mientras que para ctl-2 no fue tan marcado. Se hipotetizó que el patrón de expresión de las distintas isoformas de la enzima probablemente esté relacionado con su localización subcelular particular y que las diferencias encontradas sugieren el efecto que el glifosato pudiera estar provocando en el metabolismo específico de cada organela. Estos resultados coincidieron con los hallados por otros autores que reportaron una falta de inducción de ctl-2 en cepas transgénicas con gfp de *C. elegans*, tras la exposición a glifosato (Anbalagan et al., 2013) y al agroquímico clorpirifós (Roh & Choi, 2008).

La modificación en la expresión génica como respuesta a estrés ambiental, se utiliza cada vez más en ecotoxicología ya que ofrece valores de alta sensibilidad y puede ser muy útil para el diagnóstico temprano de la contaminación (Poynton et al., 2007; Roh et al., 2006, 2007). Quedan identificados de esta manera genes en los cuales los cambios de su expresión podrían estar indicando estrés oxidativo en el organismo. Así pues, estos resultados dan pie para que en un futuro, a través de un estudio más exhaustivo de los mismos, se pueda llegar a establecer un bioensayo indicador de cambios moleculares en nematodos expuestos a muestras ambientales de agua (potencialmente contaminadas con glifosato).

En una segunda parte de esta tesis, se seleccionaron diferentes cuencas que son representativas de áreas de monitoreo tradicional de agua: la cuenca del río Pergamino y la del río Tunuyán. Ambas fueron escogidas para comprobar la sensibilidad y la aplicabilidad del bioensayo toxicológico de crecimiento con *C. elegans*.

En el caso de Pergamino, se obtuvo por primera vez una evaluación integrada de la calidad del agua de esta cuenca en la que se incluyó la identificación y cuantificación de algunas de las principales amenazas de contaminación. Ya que esta zona es representativa de la región Pampeana y posee una intensa actividad agrícola con la secuencia de cultivos maíz-trigo/soja, caracterizada por el uso creciente de agroquímicos, se decidió analizar también la presencia de glifosato y AMPA en las muestras de agua. Se detectaron ambos compuestos a lo largo del año. El hecho de haber encontrado más porcentaje de muestras con glifosato o con AMPA solos en las ARSub podría estar indicando que quizá estén ocurriendo más eventos de aplicación de los que el ambiente podría asimilar, lo cual hace que haya una mayor percolación hasta el acuífero. En términos de concentraciones, las más altas se dieron en AUS, señalando quizá que la contaminación urbana podría estar inhibiendo el proceso de biodegradación. Respecto a las estaciones, las más elevadas para el glifosato se encontraron en verano, coincidente con la campaña de cultivos de soja, mientras que para AMPA, los mayores valores fueron en invierno. Esto podría ser debido a la alta persistencia del metabolito *per se*. Los resultados concuerdan con los reportados en informes anteriores en otras regiones (Arunakumara et al., 2013) así como en región pampeana (Vera et al., 2010). La caracterización fisicoquímica e hidrogeoquímica realizada, reveló diferencias entre las muestras (agrupadas según su origen). También por primera vez en la zona se construyó un ICA que sintetiza en un dato único la información de los diferentes parámetros de calidad de agua determinados. Con la

información obtenida de este índice se concluyó que la mayoría de los sitios de monitoreo estaban dentro de la categoría de calidad de agua *mala*, lo que indicó una fragilidad que pone en peligro las condiciones ambientales del lugar. Esto demuestra que a pesar que no se encontraron niveles de concentración de agroquímico por encima de los límites de la normativa, el estado de la calidad del agua no es bueno. Tampoco se tiene información sobre los efectos de sinergia que se puedan dar entre los herbicidas basados en glifosato y otros contaminantes, que puedan representar un riesgo en la zona.

A pesar que la necesidad de un enfoque más ecológico en la evaluación de los múltiples factores de estrés que afectan al ambiente es un tema que viene avalado por la comunicad científica, aún siguen siendo escasos los estudios para comprender cómo un sistema complejo puede responder a mezclas de sustancias químicas (Backhaus & Faust, 2012; De Laender & Janssen, 2013). De modo que se hace necesario realizar ensayos que permitan una evaluación toxicológica integral del agua en modo sencillo, rápido y económico. Para obtener un análisis más completo de las muestras de agua incluyendo un dato biológico, se realizó el bioensayo de crecimiento relativo de *C. elegans* para los 7 meses de muestreo. Para caracterizar la magnitud de los efectos tóxicos, se realizó una categorización de los mismos basada en los valores de crecimiento relativo obtenidos. Esta herramienta fue muy útil en la interpretación de la variabilidad de la respuesta biológica de *C. elegans*. Los datos mostraron que los sitios de monitoreo exhibieron diferentes efectos tóxicos, revelándose en la mayoría de las muestras una categoría de *muy tóxico* (porcentajes de 14,3 a 50) con la excepción de los puntos 1, 2, 10, 11, 12 y 14. En particular, en el grupo de aguas urbanas se obtuvieron porcentajes elevados para la categoría de *muy tóxico*, destacándose el sitio 18 que tenía un 50%, el valor más alto. En cuanto al efecto *no tóxico*, se exhibieron valores que fueron desde 14,3 hasta 83,3%. Comparando estos resultados con aquellos encontrados

en el análisis del ICA, no hubo datos que indicasen que la toxicidad y los parámetros fisicoquímicos medidos estuvieran correlacionados. Según las conclusiones del capítulo 4, se deduce que por un lado, los valores de glifosato hallados en las muestras no producirían daño oxidativo en los organismos; de hecho, los valores medidos están muy por debajo de la CE50 calculada para el nematodo. Por otro lado, puesto que se evidenció toxicidad en las muestras (revelado en el índice de categorización de efectos tóxicos) se pone de manifiesto que hay otros compuestos que no se están midiendo y que afectarían a la calidad del agua. No solamente las sustancias desconocidas que haya en las muestras podrían ser responsables de los efectos tóxicos, sino también la interacción entre ellas.

En el caso de la cuenca del río Tunuyán el bioensayo con *C. elegans* confirmó en primer lugar diferentes calidades del agua en las dos subcuencas, estando la inferior más contaminada que la superior. Sin embargo el punto de muestreo de VU exhibió una calidad similar a la de la inferior a pesar de pertenecer a la superior. En este sentido, el bioensayo fue útil para identificar posibles situaciones de riesgo toxicológico. Por ejemplo, se observaron condiciones en las cuales los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos no presentaban valores de riesgo y en consecuencia el índice calidad de agua era muy bueno y, sin embargo, los nematodos no crecieron como los controles. Esta conclusión es muy relevante pues ratifica la necesidad de incluir análisis ecotoxicológicos en monitoreos rutinarios puesto que de lo contrario, se podría estar sobreestimando la calidad de las muestras de agua.

En segundo lugar, se observó un efecto tóxico drástico en el crecimiento del nematodo durante noviembre y diciembre, probablemente asociado no sólo con la variabilidad ambiental, sino también con un aumento en el uso antrópico del agua en esos meses. Los análisis estadísticos multivariados confirmaron que los estudios

tradicionales de calidad del agua no predicen estos efectos sobre los organismos vivos. Si bien el ICA es una herramienta bien adoptada para evaluar el estado del recurso hídrico, también revela que la batería de parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos con los que se construye, exhibe serias limitaciones a la hora de comprender la situación toxicológica del agua. Esto puede ser debido al hecho de que el ICA está sesgado a los parámetros normalizados que no deben superar los límites de regulación, pero no considera otros compuestos no regulados. De manera general, son herramientas que nos dan información sobre la calidad del agua, pero a la luz de los resultados queda demostrado que no son suficientes para evaluar el estado toxicológico o predecir la presencia de posibles contaminantes y sus interacciones.

La evaluación ecotoxicológica de un cuerpo de agua debe ser abordada interdisciplinariamente. Los resultados de esta tesis indican que los ensayos ecotoxicológicos son herramientas que permiten evaluar diversas sustancias y también el efecto de muestras ambientales simples o complejas sobre las respuestas de los sistemas biológicos. Más aún, a través de este trabajo se ponderó la importancia de su uso en los monitoreos tradicionales de agua. El hecho de haber encontrado resultados similares en dos cuencas hidrogeográficas distintas y con dos realidades socioeconómicas diferentes, es muy relevante. Este tipo de ensayos pueden complementar los análisis tradicionales, alertando sobre los sitios cuyas aguas puedan ser tóxicas para ciertos organismos. De hecho, en este estudio la respuesta de *C. elegans* fue particularmente útil para detectar toxicidad en ambas cuencas, incluso cuando los parámetros del agua cumplían con los requisitos reglamentarios y la calidad de la misma se presentaba como adecuada. La mera cuantificación de contaminantes o índices de calidad de aguas aporta solo información parcial, si bien muy valiosa. En este sentido, el bioensayo de crecimiento relativo de *C. elegans* como parámetro rápido y sensible, es

una herramienta toxicológica prometedora ya que ha sido demostrado que puede determinar el impacto de dosis bajas de un contaminante o de una mezcla compleja presente en las muestras de agua, que de otra manera podría pasar desapercibida.

En consecuencia, se concluye que la visión integral de la calidad de agua viene dada por el análisis conjunto de parámetros fisicoquímicos y ecotoxicológicos que permite establecer una relación entre los elementos presentes en los cursos de agua y su impacto sobre la biota acuática y la salud del hombre. De esta manera se proporciona una evaluación más realista de los riesgos ambientales y sanitarios asociados a las crecientes interacciones de las actividades humanas con los ecosistemas. Esta información integral podrá constituir un aporte para futuros diseños de planes de estudio, caracterización y monitoreo a fin que pueda ser utilizada por diferentes organismos gubernamentales para la gestión de recursos hídricos y protección de la salud del hombre (Ouyang et al., 2016). Asimismo se podrá avanzar en la formulación de protocolos de evaluación integral de la calidad de agua, poniendo esta herramienta a disposición de la autoridad pertinente (como pueda ser la Dirección General de Irrigación). Esto cobra además mucha importancia en sitios donde las partidas presupuestarias destinadas a monitoreo y evaluación de la calidad del agua son limitadas. Atendiendo al ámbito internacional esta es la línea que se está siguiendo actualmente, de hecho en la Directiva Marco del Agua Europea se han establecido un conjunto de lineamientos para la gestión sostenible e integrada de los recursos hídricos, en el que la información ambiental sensible de datos biológicos y ecológicos desempeña un papel fundamental (EC, 2000). Otras organizaciones ambientales tales como la Red de Agua de Canadá y la Ley de Agua Limpia de la USEPA han desarrollado legislaciones que garantizan la seguridad y gobernabilidad del agua basadas en estudios integrados (Bakker & Cook, 2011; USEPA, 2015). Esta perspectiva global en la gestión

de los recursos hídricos contribuirá a la toma de decisiones para proteger el ambiente y la salud de la población.

Perspectivas futuras:

- En la cuenca de Pergamino actualmente se está trabajando (el laboratorio de nematología aplicada de la cátedra de Bioquímica de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires) en la identificación de otros contaminantes y la realización de análisis microbiológicos para complementar el análisis actual de evaluación del impacto sobre el agua. Se prevé investigar si en las situaciones de campo se observa variación en la expresión génica debida a estrés oxidativo causado por contaminantes ambientales.

- En la provincia de Mendoza se va a continuar con los monitoreos de las cuencas de los ríos Tunuyán y Mendoza. El análisis de las muestras de agua se aborda desde los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos incluyéndose ahora también el bioensayo aquí presentado, para un análisis más completo.

- Se está trabajando (el laboratorio de nematología aplicada de la cátedra de Bioquímica de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, junto con técnicos del Instituto Nacional del Agua) en el desarrollo de un ICA que combine los parámetros rutinarios que se vienen utilizando hasta ahora en los monitoreos tradicionales pero que tenga integrado como un parámetro más los datos de crecimiento relativo del nematodo, con el fin de determinar el estado real de la calidad del agua.

- Se propone avanzar en el uso de esta herramienta como método estandarizado para la evaluación integral de calidad de aguas en diferentes regiones agrícolas e industriales del país, aprovechando que en muchos territorios las cámaras de productores cuentan con servicios privados de monitoreo de calidad del agua y el ambiente. Por tanto, incorporar esta tecnología podría ser de mucho interés para estas

organizaciones. El avance en esta línea de investigación podría significar aportes al establecimiento de directrices de control y monitoreo en una futura Ley Nacional de Aguas, como está previsto en los Principios Rectores 6 y 7.

▪ A partir de ahora queda una línea de trabajo abierta para llevar a cabo experimentos con muestras de agua que procedan de diferentes puntos ambientales, susceptibles de contener glifosato. Esto podría hacerse para otros contaminantes también; de manera que se puedan establecer protocolos para la determinación de la contaminación basados en la detección de actividad de la catalasa u otros genes de respuesta a estrés oxidativo. La identificación de esos genes puede ser útil en un futuro para el desarrollo de biomarcadores o genes sensores de contaminación en muestras ambientales de agua.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abbasi, S.A., 2002. Water quality indices, state of the art report. Scientific Contribution No. INCOH/SAR-25/2002. Indian Institute of Technology, Roorkee.
- Abrahamsson, V., Sandahl, M., 2013. Impact of injection solvents on supercritical fluid chromatography. *J. Chromatography*, 1306, 80-88.
- Aebi, H.E., 1987. Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. Bergmeyer HU. Ed. Weinheim, Verlag Chemie., pp 13.
- Aguirre, G., Rudolph, A., Ahumada, R., Loyola, R., Medina, V., 2009. Toxicidad no específica en sedimentos portuarios, una aproximación al contenido de contaminantes críticos. *Rev. Biol. Mar.*, 44, 725-735.
- Aguirre Núñez, M., 2011. La cuenca hidrográfica en la gestión integrada de los recursos hídricos. Ed. REDESMA 5, 1-12.
- Albert, P.S., Riddle, D.L., 1988. Mutants of *Caenorhabditis elegans* that form dauer-like larvae. *Dev. Biol.*, 126, 270-293.
- Ali Khan, A., Paterson, R., Khan, H., 2004. Modification and application of the Canadian Council of Ministers of the Environment Water Quality Index (CCME WQI) for the communication of drinking water quality data in Newfoundland and Labrador. *Water Qual. Res. J. Canada.*, 39, 285-293.
- Al-Sarar, A.S., Abobakr, Y., Bayoumi, A.E., Hussein, H.I., 2015. Cytotoxic and genotoxic effects of abamectin, chlorfenapyr, and imidacloprid on CHOK1 cells. *Environ. Sci. Pollut. R.*, 22, 17041-17052.
- ALTEX, 2013. Proceedings of Animal Alternatives in Teaching, Toxicity Testing and Medicine, 2, 1-95.
- Altun, Z.F., Herndon, L.A., Crocker, C., Lints, R., Hall, D.H., 2012. Wormatlas, A database of behavioral and structural anatomy of *Caenorhabditis elegans*. <http://www.wormatlas.org> (consultado 20.08.2016).
- Anbalagan, C., Lafayette, I., Antoniou-Kourounioti, M., Gutierrez, C., Martin, J.R., Chowdhuri, D.K., De Pomerai, D.I., 2013. Use of transgenic GFP reporter strains of the nematode *Caenorhabditis elegans* to investigate the patterns of stress responses induced by pesticides and by organic extracts from agricultural soils. *Ecotoxicology*, 22, 72-85.
- Anderson, C.P., Leibold, E.A., 2014. Mechanisms of iron metabolism in *Caenorhabditis elegans*, *Front. Pharmacol.*, 5, 113.
- Anderson, G.L., Cole, R.D., Williams, P.L., 2004. Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23, 1235-1240.
- Andrade, F., 2011. La tecnología y la producción agrícola. El pasado y los actuales desafíos. Ed. INTA, pp 60.
- Antonopoulos, V.Z., Papamichail, D.M., Mitsiou, K.A., 2001. Statistical and trend analysis of water quality and quantity data for the Strymon River in Greece. *Hydrol. Earth. Syst. Sc.*, 5, 679-692.

- Aparicio, V.C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., Costa, J.L., 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere*, 93, 1866-1873.
- APHA, 2012. Standard Methods for examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington Am. Public Heal. Assoc., Washington, pp 1360.
- Araújo, A., Monteiro, R., Abarkelli, R., 2003. Effect of glyphosate on microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, 52, 799-804.
- ArgenBio, 2016. <http://www.argenbio.org/adc/uploads/Glifosato.pdf> (consultado 12.10.2016).
- Arunakumara, K.K.I.U., Walpola, B.C., Yoon, M.H., 2013. Metabolism and degradation of glyphosate in aquatic cyanobacteria: A review. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 7, 4084-4090.
- ASTM, 2014. E 2172 -01 Standard guide for conducting laboratory soil toxicity tests with the nematode *Caenorhabditis elegans*. Ed. American Society for Testing and Materials, Pennsylvania, pp 10.
- Auge, M., 2003. Vulnerabilidad de Acuíferos. Conceptos y Métodos. Ed. RedIRIS, pp 38.
- Auge, M.P., 2004. Hidrogeología ambiental. Ed. Facultad de Ciencias Naturales, UBA, pp 89.
- Auge, M., 2006. Agua subterránea, deterioro de calidad y reserva. Ed. HidroRed-RedIRIS. <http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/indexm.html>. 1-169.
- Backhaus, T., Faust, M., 2012. Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: A conceptual framework. *Environ. Sci. Technol.*, 46, 2564-2573.
- Baker, R.J., Hunchak-Kariouk, K., 2006. Relations of water quality to streamflow, season, and land use for four tributaries to the Toms River, Ocean County, New Jersey, 1994-99. U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2005-5274.
- Bakker, K., Cook, C., 2011. Water governance in Canada: Innovation in the context of fragmentation. *Int. J. Water Resour. Dev.*, 27, 275-289.
- Barjhoux, I., Baudrimont, M., Morin, B., Landi, L., Gonzalez, P., Cachot, J., 2012. Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Eco. Environ. Saf.*, 79, 272-282.
- Barrière, A., Félix M.A., 2005. Natural variation and population genetics of *Caenorhabditis elegans*. En: WormBook. Ed. *C. elegans* research Community. http://www.wormbook.org/chapters/www_naturalvariationgenetics/naturalvariationgenetics.html.
- Battaglin, W., 2016. Glyphosate and other Contaminants of Concern in Water, Sediment, and Soil in the United States. In Plant and Animal Genome XXIV Conference, San Diego.
- Beers, R. F., Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, 195, 133-140.
- Benachour, N., Séralini, G., 2009. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem. Res. Toxicol.*, 22, 97-105.
- Bento, C.P., Goossens, D., Rezaei, M., Riksen, M., Mol, H.G., Ritsema, C.J., Geissen, V., 2017.

- Glyphosate and AMPA distribution in wind-eroded sediment derived from loess soil. *Environ. Pollut.*, 220, 1079-1089.
- Bharti, N., Katyal, D., 2011. Water quality indices used for surface water vulnerability assessment. *Int. J. Environ. Sci.*, 2, 154-173.
- Bhutiani, R., Khanna, D.R., Kulkarni, D.B., Ruhela, M., 2016. Assessment of Ganga river ecosystem at Haridwar, Uttarakhand, India with reference to water quality indices. *Appl. Water Sci.*, 6, 107-113.
- Bilenca, D., Miñarro, F., 2004. Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal (AVPs) en las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. Ed. Fundación Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires, Argentina, pp 323.
- Blaxter, M., 2011. Nematodes: the worm and its relatives. *PLoS Biol.*, 9, e1001050.
- Boyd, W.A., Stringer, V.A., Williams, P.L., 2000. Metal LC50s of a soil nematode compared to published earthworm data. *Environ. Toxicol. Risk Assess.*, 10, 223-235.
- Boyd, W.A., Smith, M.V., Kissling, G.E., Freedman, J.H., 2010. Medium- and highthroughput screening of neurotoxicants using *C. elegans*. *Neurotoxicol. Teratol.*, 32, 68-73.
- Bozzo, A., 2010. Persistencia del glifosato y efecto de sucesivas aplicaciones en el cultivo de soja en agricultura continúa en siembra directa sobre parámetros biológicos del suelo. Tesis para obtener el grado de magister en Ciencias Ambientales. Universidad de la República, Montevideo (Uruguay), pp 135.
- Brausch, J., Brali, B., Smith, P., 2007. Acute and sub-lethal toxicity of three POEA surfactant formulations to *Daphnia magna*. *B. Environ. Contam. Tox.*, 78, 510-514.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Brenner, S., 2003. Nobel lecture. Nature's gift to science. *Biosci. Rep.* 23, 225-237.
- Bricheux, G., Le Moal, G., Hennequin, C., Coffe, G., Donnadieu, F., Portelli, C., Bohatier, J., Forestier, C., 2013. Caracterización y evolución de las comunidades biofilm acuáticos naturales expuestas *in vitro* a los herbicidas. *Ecotox. Environ. Safe.*, 88, 126-124.
- Burger, M., Fernández, S., 2004. Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. *Rev. Med. Uru.* 20, 202-207.
- Busch, W., Schmidt, S., Kühne, R., Schulze, T., Krauss, M., Altenburger, R., 2016. Micropollutants in European rivers: A mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.*, 35, 1887-1899.
- Busse, M.D., Ratcliff, A.W., Shestak, C.J., Powers, R.F., 2001. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, 33, 1777-1789.
- Cabreiro, F., Ackerman, D., Doonan, R., Araiz, C., Back, P., Papp, D., Braeckman, B.P., Gems, D., 2011. Increased life span from overexpression of superoxide dismutase in *Caenorhabditis elegans* is not caused by decreased oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.*, 51, 1575-1582.
- Calcaterra, C.P., Cabrini, S.M., Reynoso, L., 2011. Evolución y perspectivas del riego

- complementario en la zona húmeda pampeana. El caso del partido de Pergamino. En: Estudios sociales del riego en la agricultura argentina. Ed. INTA, pp 10.
- Caldicott, I.M., Larsen, P.L., Riddle, D.L., 1994. In: Cell biology: a laboratory handbook. Ed. Academic Press., San Diego, pp 389.
- Carpenter, S.R., Caraco, N.F., Correll, D.L., Howarth, R.W., Sharpley, A.N., Smith, V.H., 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecol. Appl.*, 8, 559-568.
- Casada, R., Russell, R.L., 1975. The *dauer* larva, a postembryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 46, 326-342.
- Casey, W., Jacobs, A., Maull, E., Matheson, J., Clarke, C., Lowit, A., 2015. A new path forward: the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and National Toxicology Program's Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 54, 170-173.
- Castillo, G., 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Ed. IDRC, pp 189.
- Cavalcante, D.G.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.* 655, 41-46.
- CCME, 1999. Canadian Environmental Quality Guidelines. Canadian Council of Minister of Canadian Environmental Quality Guidelines. <http://www.ec.gc.ca>.
- CCME, 2001. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Water Quality Index 1.0, User's Manual. En: Canadian environmental quality guidelines. Ed. Winnipeg: Canadian Council of Ministers of the Environment.
- C. elegans* Sequencing Consortium, 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 282, 2012-2018. <http://www.wormbase.org>.
- Cesnaitis, R., Sobanska, M.A., Versonnen, B., Sobanski, T., Bonnomet, V., Tarazona, J. V., De Coen, W., 2014. Analysis of the ecotoxicity data submitted within the framework of the REACH Regulation. Part 3. Experimental sediment toxicity assays. *Sci. Total Environ.* 475, 123-131.
- Cha, Y., Lee, J., Choi, S., 2012. Apoptosis-mediated *in vivo* toxicity of hydroxylated fullerene nanoparticles in soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*, 87, 49-54.
- Chadha, D.K., 1999. A proposed new diagram for geochemical classification of natural waters and interpretation of chemical data. *Hydrogeol. J.*, 7, 431-439.
- Chagas, C.I., Kraemer, F.B., Santanatoglia, O.J., Paz, M., Moretton, J., 2014. Biological water contamination in some cattle production fields of Argentina subjected to runoff and erosion. *Spanish J. Agr. Res.*, 12, 1008-1017.
- Chambouleyron, J., Morábito, J., Salatino, S., Mirábito, C., Medina, R., Zimmerman, M., Campos, S., Solanes, R., Nacif, N., 1993. La contaminación del agua de riego en Mendoza, Argentina. Prevención de la contaminación del agua por la agricultura y actividades afines. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Santiago de Chile.

- Chambouleyron, J., Salatino, S.E., Drovandi, A., Filippini M., Medina, R., Zimmermann, M., Nacif, N., Dediol, C., Camargo, A., Campos, S., Genovese, D., Bustos, R. Marre, M., Antonioli, E., 2002. Conflictos ambientales en tierras regadías. Evaluación de impactos en la cuenca del río Tunuyán, Mendoza, Argentina. Ed. UN Cuyo-Foncyt-INA.
- Chapman, E.E.V., Dave, G., Murimboh, J.D., 2013. A review of metal (Pb and Zn) sensitive and pH tolerant bioassay organisms for risk screening of metal-contaminated acidic soils. *Environ. Pollut.*, 179, 326-342.
- Charao, M.F., Souto, C., Brucker, N., Barth, A., Jornada, D.S., Fagundez, D., Garcia, S.C., 2015. *Caenorhabditis elegans* as an alternative *in vivo* model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. *Int. J. Nanomedicine*, 10, 5093-5106.
- Chen, P., Hsiao, K., Chou, C., 2013. Molecular characterization of toxicity mechanism of single-walled carbon nanotubes. *Biomaterials*, 34, 5661-5669.
- Cheng, Z., Tian, H., Chu, H., Wu, J., Li, Y., Wang, Y., 2014. The effect of tributyltin chloride on *Caenorhabditis elegans* germline is mediated by a conserved DNA damage checkpoint pathway. *Toxicol. Lett.* 225, 413-421.
- Claver, A., Ormad, P., Rodriguez, L., Ovelleiro, J.L., 2006. Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). *Chemosphere*, 64, 1437-1443.
- CMNUCC, 2014. 2014 Biennial Assessment and Overview of Climate finance flows Report, UNFCCC Standing Committee on Finance. Ed. UNFCCC, Bonn, Alemania, pp 92.
- COHIFE, 2003. Principios Rectores de Política Hídrica de la República Argentina. <http://www.argcapnet.org.ar/mgirh/media/biblioteca/Principios-Rectores-de-la-Politica-Hidrica-Argentina.pdf> (consultado 01.10.2016).
- Cole, R.D., Anderson, G.L., Williams, P.L., 2004. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model of organophosphate-induced mammalian neurotoxicity. *Toxicol. App. Pharm.*, 194, 248-256.
- Conover, W.J., 1980. Practical non parametric statistics, 2nd Edition. Wiley, Minneapolis.
- Core Team, R., 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org/>.
- Coupé, R.H., Kalkhoff, S.J., Capel, P.D., Gregoire, C., 2012. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest. Manag. Sci.*, 68, 16-30.
- Daouk, S., Copin, P.J., Rossi, L., Chèvre, N., Pfeifer, H.R., 2013. Dynamics and environmental risk assessment of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in a small vineyard river of the Lake Geneva catchment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 32, 2035-2044.
- [dataset] Partido de Pergamino. <http://www.pergamino.gob.ar/> (consultado 10.10.16).
- De Castro-Catalá, N., Muñoz, I., Armendáriz, L., Campos, B., Barceló, D., López-Doval, J., Pérez, S., Petrovic, M., Picó, Y., Riera, J.L., 2015. Invertebrate community responses to emerging water pollutants in Iberian river basins. *Sci. Total Environ.*, 503-504, 142-150.

- De Gerónimo, E., Aparicio, V.C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., Costa, J.L., 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere*, 107, 423-431.
- De Laender, F., Janssen, C., 2013. Brief communication: The ecosystem perspective in ecotoxicology as a way forward for the ecological risk assessment of chemicals. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 9, 34-38.
- DGI, 1996. Resolución 778: Reglamento general para el control de la contaminación hídrica, Mendoza.
- Dhawan, R., Dusenbery, D.B., Williams, P.L., 1999. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 58, 451-462.
- Dietrich, N., Tan, C.H., Cubillas, C., Earley, B.J., Kornfeld, K., 2016. Insights into zinc and cadmium biology in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 611, 120-133.
- Dougherty, E.C., 1955. The genera and species of the subfamily Rhabditinae Micoletzky, 1922 (Nematoda): a nomenclatorial analysis, including an addendum on the composition of the family Rhabditidae Örley, 1880. *J. Helminthol.*, 29, 105-152.
- Domínguez, A., Brown, G.G., Sautter, K.D., De Oliveira, C.M., De Vasconcelos, E.C., Niva, C.C., Bartz, M.L., Bedano, J.C., 2016. Toxicity of AMPA to the earthworm *Eisenia andrei* Bouché, 1972 in tropical artificial soil. *Scientific Reports*, 6, 1-8.
- Donald, D.B., Cessna, A.J., Sverko, E., Glozier, N.E., 2007. Pesticides in surface drinking-water supplies of the northern Great Plains. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1183-1191.
- Dong-Mei, Z., Yu-Jun, W., Long Cang, X.Z.H., Xiao-San, L., 2004. Adsorption and cosorption of cadmium and glyphosate on two soils with different characteristics. *Chemosphere*, 57, 1237-1244.
- Drapper, N., Smith, H., 1981. *Applied Regression Analysis* 3rd edition. Wiley, Minneapolis.
- EC, 2000. Directive 2000/60/EC EU Water Framework Directive. Ed. Office for Official Publication of the European Community, 43, 1-73.
- EC, 2002. Review report for the active substance glyphosate. Finalised in the Standing Committee on Plant Health at its Meeting on 29 June 2001 in View of the Inclusion of Glyphosate in Annex I of Directive 91/414/EEC. Glyphosate 6511/VI/99-final, 21 January 2002. Ed. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, Brussels. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/ph_ps/pro/eva/existing/list1_glyphosate_en.pdf
- El-Shenawy, N.S., 2009. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup® and its active ingredient glyphosate. *Environ. Toxicol. Pharm.*, 28, 379-385.
- Emerton, L., Bos, E., 2004. Value - counting ecosystems as an economic part of water infrastructure. Ed. UICN, Gland (Suiza) y Cambridge (Reino Unido), pp 88.
- Eom, H., Ahn, J., Kim, Y., Choi, J., 2013. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)-flavin containing monooxygenase-2 (FMO-2) signaling acts in silver nanoparticles and silver ion toxicity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 270, 106-113.

- EPA, 1993. R.E.D. facts-glyphosate. En: Prevention, Pesticides and Toxic substances. Ed. US Environmental Protection Agency, pp 7.
- EPAS, 2001. Normas de calidad de aguas y efluentes. Anexos I y II, Mendoza.
- Faria, M.S., Nogueira, A.J., Soares, A.M., 2007. The use of *Chironomus riparius* larvae to assess effects of pesticides from rice fields in adjacent freshwater ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 67, 218-226.
- Fathi, N., Hossinipannah, M., Hajihossini, M., Ranjbar, A., 2015. Effects of paraquat on testicular histomorphometry of male rats. In: *Biological Forum*, 7, 573. Research Trend.
- Fernández, N., Viciana, V., Drovandi, A., 2003. Valoración del impacto ambiental total por agroquímicos en la cuenca de río Mendoza. III Jornadas de Actualización en Riego y Fertiliriego. Mendoza, Argentina, pp 15.
- Ferrari, L., 2015. La ecotoxicología aplicada a la evaluación de la contaminación de los ríos: El caso del Río Reconquista. *Cienc. Invest.*, 65, 17-35.
- Ferraris, I.A.G., Couretot, L., 2008. Estrategias de inoculación en soja. En: *Soja en siembra directa*. Ed. AAPRESID, pp 8.
- Fire, A., 2007. Gene silencing by double-stranded RNA, *Cell Death Differ.* 14, 6966-6984.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811.
- Formento, S.N., 1998. Empresa agraria: marco jurídico y contratos más usuales. Ed. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, pp 186.
- Frank, F.C., Viglizzo, E.F., 2012. Water use in rain-fed farming at different scales in the Pampas of Argentina. *Agr. Syst.*, 109, 35-42.
- Franz, J.E, Mao, M.K., Sikorski, J.A., 1997. Glyphosate: a unique global herbicide. Ed. American Chemical Society, Washington, pp 653.
- Galindo, G., Sainato, C., Dapeña, C., Fernández-Turiel, J.L., Gimeno, D., Pomposiello, M.C., Panarello, H.O., 2002. Natural and anthropogenic features influencing water quality in NE Buenos Aires, Argentina. En: *Groundwater and human development*, Ed. CRC Press, pp 262.
- García Torres, T., Giuffré, L., Romaniuk, R., Ríos, R.P., Pagano, E.A., 2014. Exposure assessment to glyphosate of two species of annelids. *B. Environ. Contam. Tox.*, 93, 209-214.
- Gems, D., Doonan, R., 2009. Antioxidant defense and aging in *C. elegans*: is the oxidative damage theory of aging wrong?. *Cell Cycle*, 8, 1681-1687.
- Gerritse, R., Beltran, J., Hernandez, F., 1996. Adsorption of atrazine, simazine, and glyphosate in soils of the Gnangara Mound, Western Australia. *Aust. J. Soil Res.*, 34, 599-607.
- Glass, R.L., 1987. Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals. *J. Agr. Food Chem.*, 35, 497-500.

- Gomez-Eyles, J.L., Svendsen, C., Lister, L., Martin, H., Hodson, M.E., Spurgeon, D.J., 2009. Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. *Ecotox. Environ. Safe.*, 72, 71-79.
- Goscinnny, S., Unterluggauer, H., Aldrian, J., Hanot, V., Masselter, S., 2012. Determination of Glyphosate and its metabolite AMPA (Aminomethylphosphonic Acid) in cereals after derivatization by isotope dilution and UPLC-MS/MS. *Food Anal. Methods*, 5, 1177-1185.
- Gourley, B.L., Parker, S.B., Jones, B.J., Zumbrennen, K.B., and Leibold, E.A., 2003. Cytosolic aconitase and ferritin are regulated by iron in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, 278, 3227-3234.
- Guerrero, E., De Keizer, O., Córdoba, R., 2006. La aplicación del enfoque ecosistémico en la gestión de los recursos hídricos: un análisis de estudios de caso en América Latina. Ed. IUCN, pp 70.
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2010. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and prooxidant responses following short-term exposure to Roundup® a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis*, 25, 523-530.
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2012a. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide-elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicol. Environ. Mutagenesis*, 743, 1-9.
- Guilherme, S., Santos, M.A., Barroso, C., Gaivão, I., Pacheco, M., 2012b. Differential genotoxicity of Roundup® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology*, 21, 1381-1390.
- Gunningham, N., Sinclair, D., 2005. Policy instrument choice and diffuse source pollution. *J. Environ. Law*, 17, 51-81.
- Guzzella, L., Pozzoni, F., Giuliano, G., 2006. Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy. *Environ. Pollut.*, 142, 344-353.
- GWP, 2005. Catalyzing Change: a handbook for developing IWRM and water efficiency strategies. <http://www.gwpforum.org/gwp/library/Handbook.pdf>.
- Hägerbäumer, A., Höss, S., Heininger, P., Traunsperger, W., 2015. Experimental studies with nematodes in ecotoxicology: an overview. *J. Nematol.*, 47, 11-27.
- Harris, T.W., Antoshechkin, I., Bieri, T., Blasiar, D., Chan, J., Chen, W.J., De La Cruz, N. et al., 2010. WormBase: a comprehensive resource for nematode research, *Nucleic Acids Res.*, 38, 463-467.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology*, 8, R19.
- Helmcke, K., Aschner, M., 2010. Hormetic effect of methylmercury on *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 248, 156-164.

- Heredia, O.S., Comese, R.V., Zubillaga, M.S., Chirckes, J.D., Graziano, A.L., Pagano, E.A., 2014. Caracterización fisicoquímica de las aguas superficial y subterránea de Pergamino (Bs. As.). En: II IRFH 2014. Ed. Ezeiza: Instituto Nacional del Agua, pp 128.
- Hernández, J., Martinis, N., 2013. Particularidades de las cuencas hidrogeológicas explotadas con fines de riego en la provincia de Mendoza. III Jornadas de Actualización en Riego y Fertiliriego. Mendoza, Argentina, pp 17.
- Hodgkin, J., Barnes, T.M., 1991. More is not better: brood size and population growth in a self-fertilizing nematode. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 246, 19-24.
- Hodgkin, J., Herman, R.K., 1998. Changing styles in *C. elegans* genetics. *Trends Genet.*, 14, 352-357.
- Honda, H., 1924. Resistance of *Rhabditis* to acids. *Biol. Bull.* 46, 95-99.
- Hoogewijs, D., Houthoofd, K., Matthijssens, F., Vandesompele, J., Vanfleteren, J.R., 2008. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC Mol. Biol.*, 9, 1-9.
- Höss, S., Weltje, L., 2007. Endocrine disruption in nematodes: Effects and mechanisms. *Ecotoxicology*, 16, 15-28.
- Höss, S., Jänsch, S., Moser, T., Junker, T., Römbke, J., 2009. Assessing the toxicity of contaminated soils using the nematode *Caenorhabditis elegans* as test organism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72, 1811-1818.
- Höss, S., Schlottmann, K., Traunspurger, W., 2011. Toxicity of ingested cadmium to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.*, 45, 10219-10225.
- Höss, S., Ahlf, W., Bergtold, M., Bluebaum, Gronau, E., Brinke, M., Donnevert, G., Danwitz, B.V., 2012. Interlaboratory comparison of a standardized toxicity test using the nematode *Caenorhabditis elegans* (ISO 10872). *Environ. Toxicol. Chem.*, 31, 1525-1535.
- Höss, S., Menzel, R., Gessler, F., Nguyen, H.T., Jehle, J.A., Traunspurger, W., 2013. Effects of insecticidal crystal proteins (Cry proteins) produced by genetically modified maize (*Bt maize*) on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Pollution*, 178, 147-151.
- Hsu, P.C., O'Callaghan, M., Al-Salim, N., Hurst, M.R., 2012. Quantum dot nanoparticles affect the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 2366-2374.
- Hulme, S.E., Whitesides, G.M., 2011. Chemistry and the worm: *Caenorhabditis elegans* as a platform for integrating chemical and biological research. *Angewandte Chemie*, 50, 4774-807.
- Humphries, D., Byrtus, G., Anderson, A.M., 2005. Glyphosate Residues in Alberta's Atmospheric Deposition, Soils and Surface Waters. Ed. Information Centre Alberta Environment, Edmonton, Canada, pp 51.
- Hunt, P., Olejnik, N., Sprando, R.L., 2012. Toxicity ranking of heavy metals with screening method using adult *Caenorhabditis elegans* and propidium iodide replicates toxicity ranking in rat. *Food Chem. Toxicol.*, 50, 3280-3290.

- Hunt, P.R., Keltner, Z., Gao, X., Oldenburg, S.J., Bushana, P., Olejnik, N., Sprando, R.L., 2014. Bioactivity of nanosilver in *Caenorhabditis elegans*: Effects of size, coat, and shape. *Toxicol. Reports*, 1, 923-944.
- Hunt, P.R., 2016. The *C. elegans* model in toxicity testing. *J. Appl. Toxicol.*, 37, 50-59.
- IARC, 2015. Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Biological agents: a review of human carcinogens. IARC Monographs Eval. Carcinog. Risks Hum., 100(B), 1-441.
- INTA, 1972. Carta de suelos de la República Argentina. Hoja 3360-32 (Pergamino). Buenos Aires, Argentina, pp 106.
- IRAM, 1998. Agua para morteros y hormigones de cemento portland, Norma N° 1601, ICS: 91.100.30 Hormigón y productos de hormigón.
- ISO, 2010. Water quality-determination of the toxic effect of Sediment and soil samples on growth, Fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). ISO 10872. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jackson, M.L., 1976. Análisis químico de suelos. Ed. Omega, pp 662.
- Jadhav, K.B., Rajini, P.S., 2009. Neurophysiological alterations in *Caenorhabditis elegans* exposed to dichlorvos, an organophosphorus insecticide. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 94, 79-85.
- Jadiya, P., and A. Nazir., 2012. Environmental toxicants as extrinsic epigenetic factors for Parkinsonism: Studies employing transgenic *C. elegans* model. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 11, 976-983.
- Jafri Ali, S., Sharda Rajini, P., 2012. Elicitation of dopaminergic features of Parkinson's disease in *C. elegans* by monocrotophos, an organophosphorous insecticide. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 11, 993-1000.
- Jiang, Y., Chen, J., Wu, Y., Wang, Q., Li, H., 2016. Sublethal toxicity endpoints of heavy metals to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Plos One* 11, 1-12.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., Madden, T.L., 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.*, 36, 5-9.
- Ju, J.J., Ruan, Q.L., Li, Y.H., Liu, R., Yin, L.H., Pu, Y.P., 2010. Neurotoxicity evaluation of chlorpyrifos exposure with *Caenorhabditis elegans*. En: *Bioinf. Biomed. Eng. (iCBBE)*, IV International Conference on, pp. 3.
- Ju, J.J., Lieke, T., Saul, N., Pu, Y., Yin, L., Kochan, C. et al., 2014. Neurotoxic evaluation of two organobromine model compounds and natural AOBBr-containing surface water samples by a *Caenorhabditis elegans* test. *Ecotox. Environ. Safety*, 104, 194-201.
- Jung, S.K., Qu, X., Aleman-Meza, B., Wang, T., Riepe, C., Liu, Z. et al., 2015. Multi-endpoint, high-throughput study of nanomaterial toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.*, 49, 2477-2485.
- Kaletta, T., Hengartner, M.O., 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5, 387-98.

- Kammenga, J.E., Van Koert, P.H., Riksen, J.A., Korthals, G.W., Bakker, J., 1996. A toxicity test in artificial soil based on the life-history strategy of the nematode *Plectus acuminatus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 722-727.
- Kiontke, K., Gavin, N.P., Raynes, Y., Roehrig, C., Piano, F., Fitch, D.H.A., 2004. *Caenorhabditis* phylogeny predicts convergence of hermaphroditism and extensive intron loss. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101, 9003-9008.
- Kiontke, K., Fitch, D.H., 2005. The phylogenetic relationships of *Caenorhabditis* and other rhabditids. En: *WormBook*. Ed. *C. elegans* research Community. http://www.wormbook.org/chapters/www_phylogrhabditids/phylorhab.html
- Kolpin, D.W., Barbash, J.E., Gilliom, R.J., 1998. Occurrence of pesticides in shallow groundwater of the United States: initial results from the national water quality assessment program. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 558-566.
- Kraemer, F.B., Chagas, C.I., Vázquez-Amábile, G., Paz, M., Moretton, J.A., 2014. Estimación de escenarios de contaminación por coliformes fecales en una microcuenca de la Pampa Ondulada de Argentina mediante el empleo de un modelo predictivo. *Rev. F.C.A., UN Cuyo*, 46, 83-96.
- Kreuger, J., 1998. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996. *Sci. Total Environ.*, 216, 227-251.
- Kuzmanovic, M., López-Doval, J.C., De Castro-Catalá, N., Guasch, H., Petrovic, M., Muñoz, I., Ginebreda, A., Barceló, D., 2015. Ecotoxicological risk assessment of chemical pollution in four Iberian river basins and its relationship with the aquatic macroinvertebrate community status. *Sci. Total Environ.*, 540, 324-333.
- Lavado, R.S., Porcelli, C.A., Alvarez, R., 2001. Nutrient and heavy metal concentration and distribution in corn, soybean and wheat as affected by different tillage systems in the Argentine Pampas. *Soil Till. Res.*, 62, 55-60.
- Lavado, R.S., Zubillaga, M.S., Álvarez, R., Taboada, M.A., 2004. Baseline levels of potentially toxic elements in Pampas soils. *J Soil Contam.*, 13, 329-339.
- Laviè, E., Morábito, J.A., Salatino, S., 2008. Problèmes de pollution phosphatée de l'eau d'irrigation en zones aval d'oasis : le cas de la quatrième zone agricole irriguée de l'oasis du río Mendoza, Argentine. XIII World Water Congr. Int. Water Resour. Assoc., Carbondale, Illinois.
- Laviè, E., 2009. Impact anthropiques et qualité des eaux dans l'oasis de Mendoza (Argentina): diagnostic, enjeux et durabilité. Disertación doctoral, Univ. Burdeos, pp 385.
- Laviè, E., Morábito, J.A., Salatino, S.E., 2017. The Transformation of the Oases of Mendoza (Argentina): How the Provincial Socio-spatial Structure Was Reversed by the Crises of the 1980s and 2000s. En: *Oases and Globalization*. Ed. Springer International Publishing, pp 15.
- LeBel, C.P., Ischiropoulos H., Bondy S.C., 1992. Evaluation of the probe 29,79-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.*, 5, 227-231.
- Lee, S.B., Choi, J., 2006. Multilevel evaluation of nonylphenol toxicity in fourth-instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Environ. Toxicol. Chem.*, 25, 3006-3014.

- Leelaja, B.C., Rajini, P.S., 2013. Biochemical and physiological responses in *Caenorhabditis elegans* exposed to sublethal concentrations of the organophosphorus insecticide, monocrotophos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 94, 8-13.
- Lemos, M.C., 2008. What influences innovation adoption by water managers?. *Climate information use in Brazil and the United States. JAWRA*, 44, 1388-1396.
- Leung, M.C., Williams, P.L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K.J., Aschner, M., Meyer, J.N., 2008. *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. *Toxicol. Sci.*, 106, 5-28.
- Leung, M.C., Goldstone, J.V., Boyd, W.A., Freedman, J.H., Meyer, J.N., 2010. *Caenorhabditis elegans* generates biologically relevant levels of genotoxic metabolites from aflatoxin B1 but not benzo [a] pyrene *in vivo*. *Toxicol. Sci.*, kfq295.
- Lewis, J.A., Gehman, E.A., Baer, C.E., Jackson, D.A., 2013. Alterations in gene expression in *Caenorhabditis elegans* associated with organophosphate pesticide intoxication and recovery. *BMC Genomics*, 14, 291.
- Li, R., Dong Mei., Z., Y., Zhang, L., Cui, Q., He, W., 2007. Assessment of water quality and identification of pollution sources of plateau lakes in Yunnan (China). *J. Environ. Qual.*, 36, 291-297.
- Li, Y., Yu, S., Wu, Q., Tang, M., Pu, Y., Wang, D., 2012. Chronic Al₂O₃-nanoparticle exposure causes neurotoxic effects on locomotion behaviors by inducing severe ROS production and disruption of ROS defense mechanisms in nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Hazard. Mater.*, 219, 221-230.
- Lin, Y.T., Hoang, H., Hsieh, S.I., Rangel, N., Foster, A.L., Sampayo, J.N., Lithgow, G.J., Srinivasan, C., 2006. Manganous ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a shortlived *Caenorhabditis elegans* mutant. *Free Radic. Biol. Med.*, 40, 1185-1193.
- Liu, C.M., McLean, P.A., Sookdeo, C.C., Cannon, F.C., 1991. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. *App. Environ. Microb.*, 57, 1799-1804.
- Liu, Y., Zhang, Y., Liu, J., Huang, D., 2006. The role of reactive oxygen species in the herbicide acetachlor-induced DNA damage on *Bufo-raddei* tadpole liver. *Aquat. Toxicol.*, 78, 21-26.
- Liu, P., He, K., Li, Y., Wu, Q., Yang, P., Wang, D., 2012. Exposure to mercury causes formation of male-specific structural deficits by inducing oxidative damage in nematodes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 79, 90-100.
- Llario, R., Iñón, F.A., Garrigues, S., De La Guardia, M., 2006. Determination of quality parameters of beers by the use of attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. *Talanta* 69, 469-480.
- Lorenzatti, E., Maitre, M.I., Argelia, L., Lajmanovich, R., Peltzer, P., Anglada, M., 2004. Pesticide residues in immature soybeans of Argentina croplands. *Fresen. Environ. Bull.*, 13, 675-678.
- Losinno, B., Heredia, O., Sainato C., Giuffré L., Galindo, G., 2002. Impacto potencial del riego

con agua subterránea sobre los suelos en la cuenca del arroyo Pergamino, Pcia. de Bs. As., Argentina. *Ecología Austral* 12, 55-63.

- Losinno, B.N., Sainato, C.M., Giuffré, L., 2005. Propiedades edáficas y del agua subterránea: Riesgos de salinización y sodificación de los suelos, en la zona de Pergamino-Arrecifes. *Cienc. Suelo*, 23, 47-58.
- Lumb, A., Halliwell, D., Sharma, T., 2006. Application of CCME Water Quality Index to monitor water quality: a case study of the Mackenzie River Basin, Canada. *Environ. Monit. Assess.*, 113, 411-429.
- Lupi, L., Miglioranza, K.S., Aparicio, V.C., Marino, D., Bedmar, F., Wunderlin, D.A., 2015. Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Sci. Tot. Environ.*, 536, 687-694.
- Maitre, M.I., Lorenzatti, E.A., Lenardon, M.A., Enrique, S.N., 2010. Análisis de residuos de glifosato en muestras ambientales y alimentos. Taller: Aspectos ambientales del uso de glifosato, pp 31.
- Mamy, L., Gabrielle, B., Barriuso, E., 2010. Comparative environmental impacts of glyphosate and conventional herbicides when used with glyphosate-tolerant and non-tolerant crops. *Environ. Pollut.*, 158, 3172-3178.
- Maqueda, C., Undabeytia, T., Morillo, E., 1998. Retention and release of Copper on Montmorillonite as affected by the presence of a pesticide. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1200-1208.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G., Belle, R., 2002. Pesticide Roundup® provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem. Res. Toxicol.*, 15, 326-331.
- Martino, D., 1995. El herbicida glifosato: su manejo más allá de la dosis por hectárea. INIA La Estanzuela. Serie técnica N° 61, pp 25.
- Martino, D., 1997. Siembra directa en los sistemas agrícola-ganaderos del litoral. En: García Préchac F. (Ed.) Curso de actualización sobre siembra directa y conservación de suelos, Facultad de Agronomía de la Universidad de la República de Uruguay, pp 7.
- Matsuura, T., Miura, H., Nishino, A., 2013. Inhibition of gustatory plasticity due to acute nicotine exposure in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci. Res.*, 77, 155-161.
- Maupas, E., 1900. Modes et formes de reproduction des Nématodes. *Arch. Zool. Exp.*, 3. Series, 8, 463-624.
- McVey, K.A., Snapp, I.B., Johnson, M.B., Negga, R., Pressley, A.S., Fitsanakis, V.A., 2016. Exposure of *C. elegans* eggs to a glyphosate-containing herbicide leads to abnormal neuronal morphology. *Neurotoxicol. Teratol.*, 55, 23-31.
- Menzel, R., Stürzenbaum, S., Bärenwaldt, A., Kulas, J., Steinberg, C.E.W., 2005. Humic material induces behavioral and global transcriptional responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Tech.*, 39, 8324-8332.
- Menzel, R., Swain, S.C., Hoess, S., Claus, E., Menzel, S., Steinberg, C.E. et al., 2009. Gene expression profiling to characterize sediment toxicity—a pilot study using *Caenorhabditis elegans* whole genome microarrays. *Bmc. Genomics*, 10, 160.

- Meybeck, M., Kuusisto, E., Mäkelä, A., Mälkki, E., 1996. Water Quality Monitoring. A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater Quality Studies and Monitoring Programmes. Ed. Jamie Bartram and Richard Balance (UNEP/WHO), pp 400.
- Meyer, D., Williams, P.L., 2014. Toxicity testing of neurotoxic pesticides in *Caenorhabditis elegans*. J. Toxicol. Env. Heal. B, 17, 284-306.
- Miner Vega, A.J., 2011. Análisis de la cuenca del río Mendoza (Mendoza, Argentina): cuantificación del régimen pluvio-nival y propuesta de modelo para mejorar la gestión integral de sus recursos. Disertación Máster en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universidad politécnica de Valencia. Dirección: García Lorca, Andrés, pp 110.
- Modesto, K.A., Martínez, C.B., 2010. Effects of Roundup® transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. Chemosphere, 81, 781-787.
- Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Ratnin, F.T., Kalinin, A.L., 2006. Oxidative biomarkers in the freshwater characid fish, *Bryconcephalus*, exposed to organophosphorous insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). Comp. Biochem. Physiol., 143, 141-149.
- Monteiro, L., Brinke, M., Dos Santos, G., Traunsperger, W., Moens, T., 2014. Effects of heavy metals on free-living nematodes: A multifaceted approach using growth, reproduction and behavioural assays. Eur. J. Soil Biol., 62, 1-7.
- Moore, J.W., Ramamoorthy, S., 2012. Heavy metals in natural waters: applied monitoring and impact assessment. Ed. Springer Science and Business Media, pp 268.
- Moore, L.J., Fuentes, L., Rodgers, J.H., Bowerman, W.W., Yarrow, G.K., Chao, W.Y., Bridges, W.C., 2012. Relative toxicity of the components of the original formulation of Roundup® to five North American anurans. Ecotox. Environ. Safe., 78, 128-133.
- Mophin-Kani, K., Murugesan, A.G., 2014. Assessment of river water quality using macroinvertebrate organisms as pollution indicators of Tamirabarani river basin, Tamil Nadu, India. Int. J. Environ. Prot., 4, 1-14.
- Morábito, J., Salatino S., Medina R., Zimmermann M., Filippini, M., Bermejillo, A., Nacif, N., Campos, S., Dediol, C., Genovese, D., Pizzuolo, P., Mastrantonio, L., 2005. Calidad del agua en el área regadía del río Mendoza, Argentina. Rev. F.C.A., UN Cuyo, 37, 21-23.
- Morábito, J.A., Salatino, S.E., Filippini, M., Bermejillo, A., Valdés, A., Abaurre, V., 2008. Indicadores fisicoquímicos de desempeño ambiental: área regadía del río Mendoza. II Congr. Int. sobre Gestión y Trat. Integr. del Agua. Univ. Nac. Córdoba, Córdoba.
- Morábito, J.A., Salatino, S.E., Bermejillo, A., Filippini, M., Nacif, N., Campos, S., Dediol, C., Medina, R., Genovese, D., Mastrantonio, L., Stocco, A., 2011. Contaminación antrópica en el río Tunuyán, Mendoza, Argentina. Tendencias y escenarios futuros. XVI Congr. Nac. de Irrigación. "La agricultura de riego ante el cambio climático global". Culiacán, Sinaloa, México.
- Morábito, J.A., Salatino, S.E., Medina, R., Miralles, S., Dediol, C., Nacif, N., Mastrantonio, L., Ortíz, N., Burgos, V., 2012a. Indicadores de calidad de las aguas del río Tunuyán superior. Congr. Lat. Ing. y Ciencias Apl. Univ. Nac. Cuyo, Mendoza.
- Morábito, J.A., Salatino, S.E., Schilardi, C., 2012b. El desempeño del uso agrícola del agua en

los oasis de los ríos Mendoza y Tunuyán a través de nuevos indicadores. VI Jornadas de Actualización en Riego y Fertilización, Mendoza, Argentina.

- Mugni, H.D., 2008. Concentración de nutrientes y toxicidad de pesticidas en aguas superficiales de cuencas rurales. Disertación doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Dirección: Bonetto, Carlos A., pp 162.
- Myers, J.P., Antoniou, M.N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L.G. et al., 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ. Health*, 15, 1-13.
- Nam, S.H., An, Y.J., 2010. Assessing the ecotoxicity of vinyl chloride using green alga *P. subcapitata*, nematode *C. elegans*, and the SOS chromotest in a closed system without headspace. *Sci. Total Environ.*, 408, 3148-3152.
- Neamtu, M., Ciomasu, I.M., Costica, N., Costica, M., Bobu, M., Nicoara, M.N., Catrinescu, C., Van Slooten, K.B., De Alencastro, L.F., 2009. Chemical, biological, and ecotoxicological assessment of pesticides and persistent organic pollutants in the Bahlui River, Romania. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 16, 76-85.
- Nedelkoska, T.V., Low, G.C., 2004. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Anal. Chim. Acta*, 511, 145-153.
- Negga, R., Rudd, D.A., Davis, N.S., Justice, A.N., Hatfield, H.E., Valente, A.L., Fields, A.S., Fitsanakis, V.A., 2011. Exposure to Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate and glyphosate pesticides leads to neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicol.*, 32, 331-341.
- Negga, R., Stuart, J.A., Machen, M.L., Salva, J., Lizek, A.J., Richardson, S.J. et al., 2012. Exposure to Glyphosate-and/or Mn/Zn-Ethylene-bis-Dithiocarbamate-Containing Pesticides Leads to Degeneration of γ -Aminobutyric Acid and Dopamine Neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotox. Res.*, 21, 281-290.
- Neumann, M., Schulz, R., Schafer, K., Muller, W., Mannheller, W., Liess, M., 2002. The significance of entry routes as point and non-point sources of pesticides in small streams. *Water Res.*, 36, 835-842.
- Newman, M.M., Hoilett, N., Lorenz, N., Dick, R.P., Liles, M.R., Ramsier, C., Kloepper, J.W., 2016. Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Sci. Tot. Env.*, 543, 155-160.
- Nicholas, W.L., Dougherty, E.C., Hansen, E.L., 1959. Axenic cultivation of *C. briggsae* (Nematoda: *Rhabditidae*) with chemically undefined supplements; comparative studies with related nematodes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 77, 218-236.
- Nigon, V., 1949. Les modalités de la reproduction et le déterminisme du sexe chez quelques nematodes libres. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.*, 11, 1-132.
- Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W.S., 2013. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environ. Toxicol. Phar.*, 36, 539-547.
- Oliveira, R.E.S., Lima, M., Vieira, J., 2007. An indicator system for surface water quality in river basins. *Int. Assoc. Hydrol. Sci.*, 310, 128-138.

- ONU, 2002. Informe de la Cumbre Mundial sobre el Desarrollo Sostenible de Johannesburgo. <http://www.un.org/spanish/conferences/wssd/>
- Ouyang, Y., 2005. Evaluation of river water quality monitoring stations by principal component analysis. *Water Res.*, 39, 2621-2635.
- Ouyang, W., Cai, G., Huang, W., Hao, F., 2016. Temporal-spatial loss of diffuse pesticide and potential risks for water quality in China. *Sci. Tot. Env.*, 541, 551-558.
- Oyama, Y., Hayashi, A., Ueha, T., Maekawa, K., 1994. Characterization of 29,79-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. *Brain Res.*, 635, 113- 117.
- Paracampo, A.H., Mugni, H.D., Demetrio, P.M., Pardi, M.H., Bulus, G.D., Asborn, M.D., Bonetto, C.A., 2012. Toxicity persistence in runoff and soil from experimental soybean plots following insecticide applications. *J. Environ. Sci. Heal. B*, 47, 761-768.
- Paravani, E.V., Sasal, M.C., Sione, S.M., Gabioud, E.A., Oszust, J.D., Wilson, M.G., Demonte, L., Repetti, M.R., 2016. Determinación de la concentración de glifosato en agua mediante la técnica de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA). *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 32, 399-406.
- Parmar, K.S., Bhardwaj, R., 2014. Water quality management using statistical analysis and time-series prediction model. *Appl. Water Sci.*, 4, 425-434.
- Peixoto, F., 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere*, 61, 1115-1122.
- Peña, D., 2002. *Análisis de Datos Multivariantes*. Ed. McGrawHill, Madrid, pp 29.
- Peña, H., 2016. Desafíos de la seguridad hídrica en América Latina y el Caribe. En: *Serie Recursos Naturales e Infraestructura*, Ed. CEPA, Naciones Unidas, No.178, pp 57.
- Peredney, C.L., Williams, P.L., 2000. Utility of *Caenorhabditis elegans* for assessing heavy metal contamination in artificial soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39, 113-118.
- Perkin Elmer, 1982. *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry*. Perkin Elmer, Norwalk, CT.
- Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north Pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.*, 156, 61-66.
- Peterson, R.T., Nass, R., Boyd, W.A., Freedman, J.H., Dong, K., Narahashi, T., 2008. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. *Neurotoxicology*, 29, 546-555.
- Petriv, I., Rachubinski, R.A., 2004. Lack of peroxisomal catalase causes a progeric phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, 279, 19996-20001.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic. Acids Res.*, 29, e45.
- Piccolo, A., Celano, G., Arienzo, M., Mirabella, A., 1994. Adsorption and desorption of

- glyphosate in some Europeans soils. J. Environ. Sci. Healt B, 29, 1105-1115.
- Piper, A.M., 1944. A graphic procedure in the geochemical interpretation of water-analyses. Ed. Eos, Transactions American Geophysical Union, 25, 914-928.
- Pitte, P., Ferri Hidalgo, L., Espizúa, L.E., 2009. Aplicación de sensores remotos al estudio de glaciares en el Cerro Aconcagua. Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Natal, Brasil. INPE. 1473-1480.
- Pizarro, H., Vera, M.S., Vinocur, A., Pérez, G., Ferraro, M., Helman R.M., Dos Santos Afonso, M., 2016. Glyphosate input modifies microbial community structure in clear and turbid freshwater systems. Environ. Sci. Pollut. Res., 23, 5143-5153.
- Pochat, V., 2005. Entidades de gestión del agua a nivel de cuencas: experiencia de Argentina. Santiago de Chile: CEPAL-UN Serie Recursos Naturales e Infraestructura, pp 59.
- Popham, J.D., Webster, J.M., 1979. Cadmium toxicity in the free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*. Environ. Res., 20, 183-191.
- Poynton, H.C., Varshavsky, J.R., Chang, B., Cavigliolo, G., Chan, S., Holman, P.S., Loguinov, A.V., Bauer, D.J., Komachi, K., Theil, E.C., Perkins, E.J., Hughes, O., Vulpe, C.D., 2007. *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. Environ. Sci. Technol., 41, 1044-1050.
- Prata, F., Lavorenti, A., Regitano, J.B., Tornisiello, V.L., 2000. Influência da matéria orgânica na sorção e dessorção do glifosato em solos com diferentes atributos mineralógicos. R. Bras. Ci. Solo, 24, 947-951.
- Prism, G., 1994. GraphPad software. San Diego, CA, USA.
- Producción mundial de soja. <http://www.agropanorama.com/news/Produccion-Mundial-de-Soja.htm> (acceso 10.10.2016).
- Rabinovitch, J.E., Torres, F., 2004. Caracterización de los síndromes de sostenibilidad del desarrollo. El caso de Argentina. Taller "Síndromes de sostenibilidad del desarrollo en América Latina", Santiago de Chile 16 y 17 de septiembre de 2002. Ed. Naciones Unidas.
- Raley-Susman, K.M., 2014. Like a canary in the coalmine: behavioral change as an early warning sign of neurotoxicological damage. En: Pesticides-Toxic Aspects, Ed. Marcelo L. Larramendy y Sonia Soloneski. <http://dx.doi.org/10.5772/57170>
- Ranjbar, A., 2014. Evidence of oxidative damage in paraquat toxicity. Zahedan J. Res. Med. Sci., 16, 1-8.
- Ratcliff, A.W., Busse, M.D., Shestak, C.J., 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. Appl. Soil Ecol., 34, 114-124.
- Reno, U., Gutierrez M.F., Regaldo, L., Gagnetten, A.M., 2014. El impacto de Eskoba, una formulación de glifosato, en la comunidad de plancton de agua dulce. Water Environ. Res., 86, 2294-2300.
- Roberts, F., Roberts, C.W., Johnson, J.J., Kyle, D.E., Krell, T., Coggins, J.R., Chakrabarti, D., 1998. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. Nature, 393, 801-805.

- Rodrigues, B.N., Almeida, F., 1995. Guía de herbicidas. Ed. Instituto Agronómico do Paraná, Londrina, pp 675.
- Roh, J., Choi, J., 2011. Cyp35a2 gene expression is involved in toxicity of fenitrothion in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*. 84, 1356-1361.
- Roh, J.Y., Lee, J., Choi, J., 2006. Assessment of stressrelated gene expression in the heavy metal-exposed nematode *Caenorhabditis elegans*: a potential biomarker for metal-induced toxicity monitoring and environmental risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25, 2946-2956.
- Roh, J.Y., Jung, I.H., Lee, J.Y., Choi, J., 2007. Toxic effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on mortality, growth, reproduction and stress-related gene expression in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology*, 237, 126-133.
- Roh, J.Y., Choi, J., 2008. Ecotoxicological evaluation of chlorpyrifos exposure on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotox. Environ. Safe*, 71, 483-489.
- Romanowski, A., Goya, M.E., Migliori, M.L., Simonetta, S.H., Golombek, D.A., 2012. Circadian regulation of abiotic stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* (Book Chapter). En: *Abiotic Stress: New Research*, 151-169.
- Ronco, A.E., Marino, D.J.G., Abelando, M., Almada, P., Apartin, C.D., 2016. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ. Monit. Assess.*, 188, 1-13.
- Ruan, Q.L., Ju, J.J., Li, Y.H., Liu, R., Pu, Y.P., Yin, L.H., Wang, D.Y., 2009. Evaluation of pesticide toxicities with differing mechanisms using *Caenorhabditis elegans*. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 72, 746-751.
- Rudel, D., Douglas, C.D., Huffnagle, I.M., Besser, J.M., Ingersoll, C.G., 2013. Assaying environmental nickel toxicity using model nematodes. *PloS one*, 8, e77079.
- Rudgalvyte, M., VanDuyn, N., Arnaio, V., Heikkinen, L., Peltonen, J., Lakso, M., Nass, R., Wong, G., 2013. Methylmercury exposure increases lipocalin related (lpr) and decreases activated in blocked unfolded protein response (abu) genes and specific miRNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol. Lett.*, 222, 189-96.
- Rui, Q., Zhao, Y., Wu, Q., Tang, M., Wang, D., 2013. Biosafety assessment of titanium dioxide nanoparticles in acutely exposed nematode *Caenorhabditis elegans* with mutations of genes required for oxidative stress or stress response. *Chemosphere*. 93, 2289-2296.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., Van den Hoff, M.J.B., Moorman, A.F.M., 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.*, 37, 45-45.
- Sainato, C., Pomposiello M.C., Landini A., Galindo G., Malleville H., 2000. The hydrogeological sections of the Pergamino basin (Bs. As. Province, Argentina): audiomagnetotelluric and geochemical results. *Braz. J. Geophys.*, 18, 187-200.
- Salatino, S., Morábito, J., Filippini, M., Bermejillo, A., Medina, R., Zimmermann, M., Nacif, N., Campos, S., Dediol, C., Mastrantonio, L., Hernández, R., Genovese, D., S.A., 2009. Evaluación de la calidad del agua en áreas de regadío del río Tunuyán Superior (Prov. de Mendoza) para un aprovechamiento racional y sustentable (2ª Parte). XXII Congr

Nacional del Agua, Trelew.

- Salatino, S.E., Morabito, J., Laviè, E., 2014. The Northern and Central Oases of the Province of Mendoza (Argentina): water resources and sustainability challenges. *Cresc. Prodig. Cent. pour la Commun. Sci. Directe.*, pp 189-196.
- Salazar-López, N.J., Madrid, M.L.A., 2011. Herbicida Glifosato: Usos, toxicidad y regulación. *Biotecnia*, 13, 23-28.
- Saleha, B.B., Danadevi, K., Rahman, M.F., Ahuja, Y.R., Kaiser, J., 2001. Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using the comet assay. *Food Chem. Toxicol.*, 39, 361-366.
- Salgado, H., Días, H., 2014. Informe esquemático de aporte a PID 32/2011. En: Impacto en el ambiente y en población rural de los agroquímicos utilizados en cultivos transgénicos en la Región Pampeana, Argentina. Ed. [Ministerio de Agroindustria de la Nación Argentina](#), pp 8.
- Sasal, M.C., Andriulo, A.E., Wilson, M.G., Portela, S.I., 2010. Glyphosate losses by drainage and runoff from Mollisols under no-till agriculture. *Inf. Tecnol.* 21, 135-142.
- Satorre, E.H., 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura actual. *Cienc. Hoy*, 15, 24-31.
- Schlueter, A., 1977. Nitrate interference in total Kjeldahl nitrogen determinations and its removal by anion exchange resins. *Environ. Protection Agency Circular No. 600/7-77-017*.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, 7, 671-675.
- Schuster, R., Gratzfeld-Hüsken, A., 1992. A comparison of Pre- and Post-Column sample treatment for the analysis of glyphosate. Application note 5091- 3621E. Ed. Agilent Technologies, Germany.
- SENASA, 2015. Resol 350/99 Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. www.senasa.gov.ar/ (consultado 15.10.16).
- Séralini, G.E., 2015. Why glyphosate is not the issue with Roundup. A short overview of 30 years of our research. *J. Biol. Phys. Chem.*, 15, 111-119.
- Shipitalo, M.J., Owens, L.B., 2006. Tillage system, application rate, and extreme event effects on herbicide losses in surface runoff. *J. Environ. Qual.*, 35, 2186-2194.
- Sihtmäe, M., Blinova, I., Künnis-Beres, K., Kanarbik, L., Heinlaan, M., Kahru, A., 2013. Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. *Appl. Soil Ecol.*, 72, 215-224.
- Simeonov, V., Einax, J.W., Stanimirova, I., Kraft, J., 2002. Environmetric Modeling and Interpretation of River Water Monitoring Data. *Anal. Bioanal. Chem.*, 374, 898-905.
- Smith, H.K., Luo, L., O'Halloran, D., Guo, D., Huang, X.Y., Samuel, A.D., Hobert, O., 2013. Defining specificity determinants of cGMP mediated gustatory sensory transduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 194, 885-901.

- Snell, T.W., Brogdon, S.E. Morgan, M.B., 2003. Gene expression profiling in ecotoxicology. *Ecotoxicology*, 12, 475-483.
- Sochová, I., Hofman, J., Holoubek, I., 2007. Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Int.*, 33, 798-804.
- Sprankle, P., Meggit, W.F., Penner, D., 1975. Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.*, 23, 229-234.
- SSRH INA, 2002. Atlas Digital de los Recursos Hídricos Superficiales de la República Argentina. Ed. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, Argentina. <http://pag-ar00.minplan.gov.ar/atlas2.htm>.
- Statistics Canada, 2014. CCME: Canadian Environmental Sustainability Indicators, Freshwater Quality Indicator: Data Sources and Methods. Publishing Services Government of Canada, Ottawa (doi:16-256-XIE)
- Stiernagle, T., 2005. Maintenance of *C. elegans*, pp 16. En: *C. elegans: a practical approach*. Oxford University Press, New York.
- Sulston, J., Hodgkin, J., 1988. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 587.
- Surjo Prabha, P., Manoj, S., 2009. Screening of agrochemicals on *Caenorhabditis elegans*. *Advanced Biotech.*, 8, 17-21.
- Sutadian, A.D., Muttill, N., Yilmaz, A.G., Perera, B.J., 2016. Development of river water quality indices-a review. *Environ. Monit. Assess.* 188, 58-86.
- Swain, S.C., Keusekotten, K., Baumeister, R., Stürzenbaum, S.R., 2004. *C. elegans* metallothioneins: new insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis. *J. Mol. Biol.*, 341, 951-959.
- Tanimoto, Y., Yamazoe-Umemoto, A., Fujita, K., Kawazoe, Y., Miyanishi, Y., Yamazaki, S. J., Fei, X., Busch, K.E., Gengyo-Ando. K., Nakai, J., Iino, Y, Iwasaki, Y., Hashimoto, K., Kimura, K.D., 2017. Calcium dynamics regulating the timing of decision-making in *C. elegans*. *eLife*, 6, e21629.
- Tesfamichael, A.A., Kaluarachchi, J.J., 2006. A methodology to assess the risk of an existing pesticide and potential future pesticides for regulatory decision-making. *Environ. Sci. Policy*, 9, 275-290.
- Thuong, N., Yoneda, M., Ikegami, M., Takakura, M., 2013. Source discrimination of heavy metals in sediment and water of To Lich River in Hanoi City using multivariate statistical approaches. *Environ. Mon. Assess.*, 185, 8065-75.
- Traunsperger, W., Haitzer, M., Höss, S., Beier, S., Ahlf, W., Steinberg, C.E.W., 1997. Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) – A method for testing in liquid medium and whole sediment samples. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 245-250.
- Tsui, M.T., Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52, 1189-1197.

- Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2008. Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup®) in a subtropical wetland. *Chemosphere*, 71, 439-446.
- Turner, E.A., Kroeger, G.L., Arnold, M.C., Thornton, B.L., Di Giulio, R.T., Meyer, J.N., 2013. Assessing different mechanisms of toxicity in mountaintop removal/valley fill coal mining-affected watershed samples using *Caenorhabditis elegans*. *PloS one*, 8, e75329.
- UCCC, 1974. Guidelines for Interpretations of water Quality for Irrigation. Technical Bulletin, University of California Committee of Consultants, California, USA, pp 8.
- UN, 2011. Policy Brief: Water Quality. Available online: http://www.unwater.org/downloads/waterquality_policybrief.pdf (consultado 13.04.2016).
- UN WWDR, 2009. Ed. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. Disponible en http://www.unesco.org/water/wwap/wwdr/wwdr2/table_contents.shtml (consultado 10.10.2016).
- UNCED, 1992. Report of the United Nations Conference on Environment and Development. Ed. United Nations, New York.
- UNEP, 2006. Challenges to International Waters: Regional Assessments in a Global Perspective. Nairobi: Programa de las Naciones Unidas para el Ambiente. Ed. UNEP/Earthprint, 2006, pp 120.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A.M., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.*, 35, 71-74.
- USEPA, 2015. Quality Criteria for Water; Office of Water and Hazardous. Materials, Washington DC.
- Van Raamsdonk, J.M., Hekimi, S., 2010. Reactive Oxygen Species and Aging in *Caenorhabditis elegans*: Causal or Casual Relationship?. *Antioxid. Redox Signal*, 13, 1911-1953.
- Venkatesharaju, K., Ravikumar, P., Somashekar, R.K., Prakash, K.L., 2010. Physico-chemical and bacteriological investigation on the river cauvery of Kollegal stretch in Karnataka. *Kathmandu Univ. J. Sci. Eng. Technol.*, 6, 50-59.
- Vera, M.S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G.L., Rodríguez, P., Mugni, H., Pizarro, H., 2010. New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19, 710-721.
- Viglizzo, E.F., Roberto, Z.E., Filippín, M.C., Pordomingo, A.J., 1995. Climate variability and agroecological change in the Central Pampas of Argentina. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 55, 7-16.
- Viglizzo, E.F., Lértora, F.A., Pordomingo, A.J., Bernardos, J., Roberto, Z.E., Del Valle, H., 2001. Ecological lessons and applications from one century of low external-input farming in the pampas of Argentina. *Agric. Ecosyst. Environ.* 81, 65-81.
- Viglizzo, E.F., Frank, F.C., 2006. Land-use options for Del Plata Basin in South America: tradeoffs analysis based on ecosystem service provision. *Ecol. Econ.* 57, 140-151.

- Viglizzo, E.F., Ricard, M.F., Jobbágy, E.G., Franka, F.C., Carreño, L.V., 2011. Assessing the cross-scale impact of 50 years of agricultural transformation in Argentina. *Field Crop. Res.*, 124, 186-194.
- Viñuela, A., Snoek, L.B., Riksen, J.A., Kammenga, J.E., 2010. Genome-wide gene expression analysis in response to organophosphorus pesticide chlorpyrifos and diazinon in *C. elegans*. *PloS one*, 5, e12145.
- Vryzas, Z., Vassiliou, G., Alexoudis, C., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2009. Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece. *Water Res.*, 43, 1-10.
- Wah Chu, K., Chow, K.L., 2002. Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. *Aquat. Toxicol.*, 61, 53-64.
- Wang, D., Wang, Y., Shen, L., 2010. Confirmation of combinational effects of calcium with other metals in a paper recycling mill effluent on nematode lifespan with toxicity identification evaluation method. *J. Environ. Sci.*, 22, 731-737.
- Wang, Y., Ezemaduka, A., 2014. Combined effect of temperature and zinc on *Caenorhabditis elegans* wild type and daf-21 mutant strains. *J. Therm. Biol.*, 41, 16-20.
- Wu, Q., Nouara, A., Li, Y., Zhang, M., Wang, W., Tang, M., Ye, B., Ding, J., Wang, D., 2013. Comparison of toxicities from three metal oxide nanoparticles at environmental relevant concentrations in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*. 90, 1123-1131.
- Wernersson, A.S., Carere, M., Maggi, C., Tusil, P., Soldan, P., James, A., et al., 2015. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environ. Sci. Eur.*, 27, 1-11.
- WHO, 1996. Guidelines for drinking water quality, 2 ed. En: volume 2: Health criteria and other supporting information. Ed. World Health Organization, Geneva.
- WHO, 1986. Application of risk analysis to food standards issues: Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, WHO/FNU/FOS/95.3
- WHO, 2013. Water Quality and Health Strategy 2013-2020.
http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2013/water_quality_strategy/en/ (consultado 01.08.16).
- WWAP, 2016. Informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo: agua y empleo. Ed. UNESCO, Paris. <http://unesdoc.unesco.org/images/0024/002441/244103s.pdf> (consultado 17.06.2016).
- Xing, X., Guo, Y., Wang, D., 2009. Using the larvae nematode *Caenorhabditis elegans* to evaluate neurobehavioral toxicity to metallic salts. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72, 1819-1823.
- Yamamuro, D., Uchida, R., Takahashi, Y., Masuma, R., Tomoda, H., 2011. Screening for microbial metabolites affecting phenotype of *Caenorhabditis elegans*. *Biol. Pharm. Bull.*, 34, 1619-1623.
- Yochem, J.K., 2006. Nomarski images for learning the anatomy, with tips for mosaic analysis. En: WormBook. Ed. *C. elegans* research Community.

http://www.wormbook.org/chapters/www_nomarskianatomymosaic/nomarskianatomymosaic.html

- York, W.S., Agravat, S., Aoki-Kinoshita, K.F., McBride, R., Campbell, M.P., Costello, C.E. et al, 2014. MIRAGE: the minimum information required for a glycomics experiment. *Glycobiology*, 24, 402-406.
- Zhang, G., Sachse, M., Prevost, M. C., Luallen, R. J., Troemel, E. R., Felix, M. A., 2016. A large collection of novel nematode-infecting microsporidia and their diverse interactions with *Caenorhabditis elegans* and other related nematodes. *PLoS Pathog.*, 12, e1006093.
- Zhang, L., Li, Q., Chen L., Zhang A, He J, Wen Z, Wu L., 2015. Toxicity of surface water from Huangpu River to luminous bacteria (*Vibrio qinghaiensis* sp. Q67) and zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 112, 137-43.
- Zhao, Y., Lin, Z., Jia, R., Li, G., Xi, Z., Wang, D., 2014. Transgenerational effects of traffic-related fine particulate matter (PM_{2.5}) on nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Hazard Mater.*, 274, 106-114.
- Zhuang, Z., Zhao, Y., Wu, Q., Li, M., Liu, H., Sun, L., Gao, W., Wang, D., 2014. Adverse Effects from Clenbuterol and Ractopamine on Nematode *Caenorhabditis elegans* and the Underlying Mechanism. *PLoS One*. 9, e85482.
- Zong, Y., Gao, J., Feng, H., Cheng, B., Zhang, X., 2014. Toxicity of 7-ketocholesterol on lethality, growth, reproduction, and germline apoptosis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 77, 716-723.

APÉNDICES

Apéndice 1. Normativa internacional en materia de agroquímicos.

<u>Normativa con consecuencias operativas directas en el manejo de plaguicidas</u>
<i>Codex Alimentarius</i> , Comité del Codex sobre Residuos de Plaguicidas.
Protocolo de Montreal: Tratado para la protección de la capa de ozono, reduciendo la producción y consumo de numerosas sustancias.
Convenio de Basilea: Trata sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación.
Convenio de Rotterdam: Procedimiento de consentimiento fundamentado previo, aplicado a ciertos plaguicidas y productos químicos peligrosos objeto de comercio internacional (1998).
Convenio de Estocolmo: Contaminantes orgánicos persistentes (2001).
<u>Normativa que proporciona un contexto de política general sobre manejo de plaguicidas</u>
Convenio sobre la Seguridad en la utilización de los Productos Químicos en el Trabajo (1990).
Declaración de Río sobre el Ambiente y el Desarrollo, proclamada por la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Ambiente y el Desarrollo (1992).
Programa 21: Programa de Acción Mundial para el desarrollo sostenible (cap. 14: Fomento de la Agricultura y del Desarrollo Rural Sostenibles; cap. 19: Gestión ecológicamente racional de los productos químicos tóxicos, incluida la prevención del tráfico internacional ilícito de productos tóxicos y peligrosos) (1992).
Convenio sobre la Diversidad Biológica (1992).
Convenio sobre la Prevención de Accidentes Industriales Mayores (1993).
Declaración de Roma sobre la Seguridad Alimentaria Mundial y Plan de Acción de la Cumbre Mundial sobre la Alimentación (1996).
Declaración Mundial de la Salud (1998).

Apéndice 2. Normativa nacional ambiental. Uso y comercialización de plaguicidas.

<u>Normativa Nacional</u>	
<u>Legislación básica vigente</u>	
Ley General del Ambiente N°25.675	
Decreto Ley N° 3489/58: Establece el control de la Secretaría de Agricultura para la venta de productos químicos o biológicos y sus coadyuvantes, destinados a tratamientos de los enemigos animales y vegetales de las plantas cultivadas. Fija la obligación de registro bajo la condición que estipule la reglamentación.	Resolución N° 871/2010: Establece definiciones y requisitos de inscripción de los productos denominados <i>Línea Jardín</i> .
Decreto N° 5769/59: Reglamenta el Decreto Ley anterior. Indica los productos que se considerarán como especialidades de terapéutica vegetal. Fija los requisitos para la inscripción de empresas, marbetes, envases. Crea el Registro Nacional de Terapéutica Vegetal.	Resolución Aduana 2013/93: Solicitud de autorizaciones de importación al IASCAV (SENASA) de todos los productos que se identifican por sus posiciones arancelarias.
Resolución SENASA N° 45/2001: Crea el Registro de Productos Fitosanitarios Destinados Exclusivamente para la Exportación, en el ámbito de la Coordinación de Agroquímicos y Biológicos de la Dirección de Agroquímicos, Productos Farmacológicos y Veterinarios.	Resolución SENASA121/2011: Registro de Packs de Productos Fitosanitarios y/o Fertilizantes. Resolución IASCAV (SENASA) 359/96: Establece lista de expertos toxicólogos y ecotoxicólogos. Fija los requisitos para su habilitación.
Resolución SENASA 500/2003: Sistema Federal de Fiscalización de Agroquímicos y Biológicos (SIFFAB).	Resolución MINAGRI 7/2013. Creación de un Comité asesor en bioinsumos de uso agropecuario (CABUA)
Resolución SENASA 816/2006: Normas para el etiquetado de los productos fitosanitarios formulados de uso agrícola.	Resolución SAGyP No 34/93: Actualización de requisitos de inscripción de productos de terapéutica vegetal. Impurezas: definición; obligatoriedad de declaración.

Resolución SENASA 783/2005: Procedimiento de inscripción de un técnico concentrado (TK) en el Registro Nacional de Terapéutica Vegetal que lleva la dirección de agroquímicos, productos farmacéuticos y veterinarios. A los efectos dispuestos en el artículo 1° de la presente resolución, defínase TK como: el producto obtenido de un proceso de elaboración y que resulta compuesto por: el ingrediente activo, disolventes apropiados e impurezas asociadas al proceso de síntesis, pudiendo contener pequeñas cantidades de aditivos necesarios. El producto no debe contener tensioactivos.	
Resolución SAGyP 350/99: Se aprueba el nuevo texto del “Manual de Procedimientos, Criterios de Alcances para el Registro de Productos Fitosanitarios en la República Argentina”.	Resolución SAGyP 1140/94: Incorpora a los usuarios con obligatoriedad de registro.
Disposición de orden federal 11/85: Reglamenta las características de los envases de plaguicidas.	Resolución SAGyP 440/98: Se aprueba el “Manual de Procedimientos, Criterios de Alcances para el Registro de Productos Fitosanitarios en la República Argentina”. Solo vigente el anexo II en lo que refiere a la confidencialidad de la información y el estado de productos bajo patente.
Resolución SENASA 532/2011. Prohíbese la elaboración, importación, exportación, fraccionamiento, comercialización y uso de diversas sustancias activas, para uso agropecuario.	Resolución SENASA 369/2013. Créase el Sistema de Trazabilidad de Productos Fitosanitarios y Veterinarios.
Resolución SENASA 821/2011. Aprueba el listado de coadyuvantes de formulación, no permitidos en productos de uso agrícola sujetos a inscripción en el Registro Nacional de Terapéutica Vegetal.	Resolución SENASA 299/2013. Créase el Sistema Federal Integrado de Registros de Aplicadores de Productos Fitosanitarios.
<u>Normas que fijan Límites Máximos de Residuos y establecen prohibiciones</u>	
Ley del Poder Ejecutivo Nacional 17751/68: Prohibición de plaguicidas en base a dieldrin, heptacloro y sus sinónimos y de hidrocarburos clorados.	Ley del Poder Ejecutivo Nacional 20418/73: Establece las Tolerancias y Límites Administrativos de Residuos de plaguicidas en productos y subproductos de la agricultura y la ganadería.
Ley del Poder Ejecutivo Nacional 18796/89: Determinación de residuos de plaguicidas.	Resolución SENASA 934/2010. Requisitos que deben cumplir los productos y subproductos agropecuarios para consumo interno. Además fija los límites máximos de residuos de los productos fitosanitarios.
Ley del Poder Ejecutivo Nacional 18073/69: Prohibición de sustancias capaces de afectar la salud humana y animal (dieldrin, endrin, heptacloro y HCH) para el tratamiento de praderas naturales y artificiales. Establece los LMR de plaguicidas en productos y subproductos agropecuarios.	Disposición S.N.S.V. 79/78: Prohibición de aplicación de insecticidas formulados con dieldrin, endrin, heptacloro, clordano, HCH, metoxicloro, canfenoclorado y DDT en ciertos cultivos.

Disposición de orden federal 48/72: Prohibición de gorgojicidas organoclorados, Prohibición de insecticidas organoclorados, en granos y subproductos para alimentación animal.	Resolución SAGPyA 750/2000: Prohíbase la producción, importación, fraccionamiento, comercialización y uso de las sustancias activas HCB (hexaclorobenceno), canfeclor, metoxicloro, dinocap, fenil acetato de mercurio, talio y sus compuestos, y pentaclorofenol y sus sales, así como también los productos fitosanitarios formulados en base a estos.
Resolución 1030/92: Prohibición total de heptacloro.	Disposición de orden federal 03/83: Prohibición del tratamiento con plaguicidas fumigantes a granos, productos y subproductos de cereales y oleaginosas, durante la carga de camiones o vagones y su tránsito hacia destino. Modificaciones en marbetes.
Resolución 606/93: Prohibición total metilparathión, etilparathión. Resolución SAGPyA 20/95: Fija límites máximos de presencia de residuos en productos y subproductos vegetales.	Resolución 10/91: Prohibición de uso en cultivos hortícolas y frutícolas de principios activos: monocrotofos, metil-paratión, etil-parathion, metil-azinfos, etil-azinfos. Prohibición de uso en perales, manzanos y durazneros de principios activos etion, carbofuran y disulfoton. Prohibición de heptacloro como polvo mojable o suspendible. Prohibición de hexaclorobenceno como terápico de semillas.
<u>Listado de principios activos prohibidos y/o restringidos</u>	
Dentro de este listado, encontramos la prohibición total del uso de Endosulfan (Resolución SENASA N° 511/2012).	
<u>Otras normas</u>	
<u>El Instituto Argentino de Racionalización de Materiales (IRAM) ha desarrollado normas que tienden a un racional control de calidad de las formulaciones de plaguicidas</u>	
Norma IRAM 12.151: Formulaciones de plaguicidas. Plan sistemático de control. Calificación de resultados de análisis y clasificación en categorías. Norma IRAM 12150: Formulaciones de plaguicidas aplicables en medio acuoso. Método biológico de laboratorio para ensayar su toxicidad simulando aplicaciones de alto volumen. Norma IRAM 12074: Plaguicidas, formulaciones armonizadas.	

Apéndice 3. Normativa nacional e internacional de calidad de aguas para la construcción del ICA de la región pampeana

Normativa de aguas	T°C	pH	Cl- mg L ⁻¹	Cu ²⁺ mg L ⁻¹	NO ³⁻ mg L ⁻¹	SO ₄ ²⁻ mg L ⁻¹	Zn ²⁺ mg L ⁻¹	CrTot mg L ⁻¹	Cd mg L ⁻¹	Mn mg L ⁻¹	FeTot mg L ⁻¹	Glif. µg L ⁻¹
Decreto 831/93 Ley 24.051 Protección de la vida acuática. Aguas superficiales.				<0,002			<0,03	<0,002	<0,0002	<0,1		
ACUMAR. Uso de agua IV. Protección de la vida acuática. Aguas superficiales	<30							<0,002				
Res. N° 42/06. Autoridad de aguas de la provincia de Buenos Aires.		6,5-9	<625			<625						
EPA. Criterio nacional recomendado de calidad de agua-protección de la vida acuática. Exposición crónica.		6,5-9	<230/<860				<0,12	<0,074	<0,00072		<1	
CCME. Directrices de calidad de aguas para la protección de la vida acuática. Exposición crónica.		6,5-9	<120/<640		<13		<0,03	<0,001	<0,00009		<0,3	<0,08

Declaro que el material incluido en esta tesis, es a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros) y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.